



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

LORA DUKIĆ

**SIGNIFICANCE OF NEUROSIN AND  
CLUSTERIN CONCENTRATION IN  
DIFFERENTIAL DIAGNOSTICS OF  
DEMENTIA**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO – BIOKEMIJSKI FAKULTET

LORA DUKIĆ

**ZNAČAJNOST KONCENTRACIJE  
NEUROZINA I KLASITERINA U  
DIFERENCIJALNOJ DIJAGNOSTICI  
DEMENCIJA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Ana-Maria Šimundić

Zagreb, 2016.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

LORA DUKIĆ

**SIGNIFICANCE OF NEUROSIN AND  
CLUSTERIN CONCENTRATION IN  
DIFFERENTIAL DIAGNOSTICS OF  
DEMENTIA**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

Ana-Maria Šimundić

Zagreb, 2016

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja Biomedicine i zdravstva, polje Farmacija, grana Medicinska biokemija.

## SAŽETAK

Alzheimerova bolest (engl. Alzheimer's disease, AD) je najčešća demencija karakterizirana stvaranjem plakova i neurofibrilarnih spletova. Vaskularna demencija (VAD) je druga najučestalija vrsta demencije i nastaje uslijed ishemijskih, hipoperfuzijskih ili hemoragičnih moždanih lezija. Ciljevi ovog rada su: ispitati diferencijalno dijagnostičko značenje određivanja serumske koncentracije neurozina (humanog kalikreina 6, KLK6), klasterina (CLU) i adiponektina (ADPN), te upalnog biljega interleukina-6 (IL-6) u razlikovanju AD i VAD; procijeniti značenje ispitivanih biljega u razlikovanju kognitivno zdravih ispitanika iste dobi od oboljelih od demencije i onih ispitanika iste dobi koji imaju blagi kognitivni poremećaj u odnosu na one s dijagnozom AD i VAD; procijeniti korelaciju ispitivanih biljega sa standardnim pokazateljima kognitivnog deficita.

Ispitivanjem je obuhvaćeno 70 bolesnika s AD i 67 bolesnika s VAD koji su u neprekidnom slijedu pristizali na redovnu neurološku obradu u Kliniku za neurologiju KBC-a Sestre milosrdnice u Zagrebu. Skupina kontrolnih ispitanika iste dobi podijeljena je na kognitivno zdrave ( $N = 50$ ) i one s blagim kognitivnim poremećajem ( $N = 48$ ). U okviru rutinske neurološke obrade provedeni su neuropsihološki testovi Mini Mental State Examination (MMSE) i Montreal Cognitive Assessment (MoCA). Korištene su slikovne tehnike: kompjuterizirana tomografija mozga (MSCT), Colour Doppler Flow Imaging (CDFI) i transkranijaska Doppler sonografija. Rutinski biokemijski testovi izrađeni su na automatskom biokemijskom analizatoru. Koncentracije biljega KLK6 i CLU su određene ELISA metodom, a koncentracija ADPN je određena imunoturbidimetrijom na automatskom biokemijskom analizatoru. Koncentracija IL-6 je određena na imunokemijskom analizatoru. Ovisno o vrsti razdiobe dobivenih rezultata, za testiranje razlika korišteni su statistički testovi Kruskal Wallis i ANOVA. Za analizu korelacije koristio se Spearmanov, odnosno Pearsonov test. Statistička analiza provedena je pomoću programa MedCalc.

Kod ispitivanih skupina je nađena razlika za one testove koji se rutinski koriste u neurološkoj obradi dementnih bolesnika. Koncentracije ispitivanih biljega KLK6, CLU i ADPN u serumu nisu se razlikovale između skupina ( $P = 0,137$ ,  $P = 0,178$  i  $P = 0,268$ ). Koncentracije upalnog biljega IL-6 značajno su se razlikovale između ispitivanih skupina ( $P = 0,014$ ), s najvećim medijanom koncentracije u skupini bolesnika s VAD (4,1 pg/mL) i najmanjim medijanom koncentracije u skupini s MCI (2,3 pg/mL).

Koncentracije ispitivanih biljega KLK6, CLU i ADPN nisu se značajno razlikovale između oboljelih od AD i VAD. Također, ispitivani biljezi ne pokazuju zadovoljavajuću mogućnost razlikovanja kognitivno zdravih ispitanika iste dobi od bolesnika s demencijom, kao što ne pokazuju diskriminacijski potencijal kada je u pitanju razlikovanje skupine iste dobi s dijagnozom blagog kognitivnog poremećaja od skupine s dijagnozom AD, odnosno VAD. Određivanje koncentracije upalnog biljega IL-6 se pokazalo korisnim u razlikovanju ispitivanih skupina. Koncentracije ispitivanih biljega nisu korelirale sa rezultatima standardnih pokazatelja kognitivnog oštećenja.

Ključne riječi: neurozin/humani kalikrein 6/klasterin/adiponektin/interleukin-6/demencija

## SUMMARY

Alzheimer's disease (AD) is the most frequent dementia characterized by formation of plaques and neurofibrillary tangles. Vascular dementia (VAD) is the second most frequent type of dementia, which is caused by ischemic, hypoperfusive or hemorrhagic brain lesions. The aims of this study are: assessment of potential serum biomarkers neurosin (human kallikrein 6, KLK6), clusterin (CLU), adiponectin (ADPN) and inflammatory marker interleukin – 6 (IL-6) in differential diagnostics of AD and VAD; assessment of potential of KLK6, CLU, ADPN and IL-6 to separate age-matched cognitively healthy individuals from those who are demented and to separate those individuals with symptoms of mild cognitive impairment (MCI) from those with overt AD or VAD; assessment of correlation of KLK6, CLU, ADPN and IL-6 with results of parameters regularly used for determination of cognitive deficit.

70 patients with diagnosis of AD and 67 patients with VAD were included in study in consecutive order during their routine neurological follow-up in University Department of Neurology in Medical School University Hospital Sestre milosrdnice, Zagreb. Control group of age-matched individuals consisted of cognitively healthy individuals (N = 50) and those with mild cognitive impairment (MCI) (N = 48). Neuropsychological tests Mini Mental State Examination (MMSE) and Montreal Cognitive Assessment (MoCA) were done as part of routine neurological examination. Neuroimaging techniques multi slice computed tomography (MSCT), Colour Doppler Flow Imaging (CDFI) and transcranial Doppler sonography were used. Routine biochemistry tests were determined on automated biochemistry analyzer. Concentrations of potential biomarkers were measured using ELISA method for KLK6 and CLU, and concentration of ADPN was measured using immunoturbidimetry on automated biochemistry analyzer. Concentration of IL-6 was determined using immunochemistry analyzer. Depending on data distribution, statistic tests Kruskal Wallis and ANOVA were used for difference testing. For correlation analysis Spearman and Pearson tests were performed. Statistical analysis was done with MedCalc program.

Difference between tested groups was found for those tests which are routinely used for neurological follow-up of demented patients. Concentrations of potential biomarkers KLK6, CLU and ADPN did not differ between tested participant groups ( $P = 0,137$ ,  $P = 0,178$  and  $P = 0,268$ ). Concentrations of IL-6 were significantly different for tested groups ( $P = 0,014$ ), with

highest median of concentration in VAD group (4,1 pg/mL) and lowest median of concentration in MCI group (2,3 pg/mL).

Concentrations of investigated biomarkers KLK6, CLU and ADPN did not differ significantly between AD and VAD patient group. Also, capability of tested biomarkers to differentiate age-matched cognitively healthy participants from patients with diagnosis of dementia was not sufficient, as well as their discriminating potential for age-matched participants with MCI compared to AD and VAD patient groups. Measurement of concentration of inflammatory marker IL-6 proved to be useful in discriminating between tested groups. Concentrations of potential biomarkers did not correlate with results of standard indicators of cognitive deficiency.

Keywords: neurosin/human kallikrein 6/clusterin/adiponectin/interleukin-6/dementia



# Sadržaj

1	UVOD .....	1
1.1	Definicija i vrste demencije .....	1
1.1.1	Osnovne informacije o demenciji i podaci o zastupljenosti .....	1
1.2	Funkcija pamćenja .....	1
1.3	Podjela demencija .....	2
1.4	Dijagnostički kriteriji .....	3
1.4.1	Alzheimerova bolest .....	3
1.4.2	Vaskularna demencija .....	4
1.4.3	Blagi kognitivni poremećaj .....	5
1.5	Patofiziologija i etiologija Alzheimerove bolesti i vaskularne demencije .....	6
1.5.1	Molekularni mehanizmi nastanka senilnih plakova i neurofibrilarnih čvorova ...	6
1.5.2	Etiologija i patološki entiteti koji dovode do vaskularne demencije .....	11
1.6	Preventivne mjere i terapijska sredstva .....	12
1.7	Klinička i laboratorijska dijagnostika demencija .....	12
1.7.1	Neurološki pregled, neuropsihološki testovi i slikovne tehnike .....	12
1.7.2	Laboratorijska dijagnostika .....	13
1.8	Biokemijski biljezi demencije .....	14
1.8.1	Definicija biljega .....	14
1.8.2	Amiloid $\beta$ 42, tau protein, fosforilirani tau protein .....	14
1.8.3	Drugi potencijalni biokemijski biljezi u likvoru i krvi .....	15
1.9	Novi biokemijski biljezi demencije .....	16
1.9.1	Neurozin (humani kalikrein 6) .....	16
1.9.2	Klasterin .....	20
1.9.3	Adiponektin .....	24
1.9.4	Interleukin-6 .....	26
2	HIPOTEZE I CILJEVI .....	29
3	ISPITANICI I METODE .....	31
3.1	Ispitanici .....	31
3.2	Metode .....	32
3.2.1	Određivanje koncentracije interleukina - 6 .....	33

3.2.2	Određivanje koncentracije adiponektina .....	34
3.2.3	Određivanje koncentracije klasterina .....	34
3.2.4	Određivanje koncentracije neurozina (humanog kalikreina 6) .....	35
3.3	Statistička analiza .....	35
4	REZULTATI.....	37
5	RASPRAVA .....	54
6	ZAKLJUČCI.....	73
7	LITERATURA .....	75
8	POPIS KRATICA.....	85
9	ŽIVOTOPIS.....	87

# **1 UVOD**

## **1.1 Definicija i vrste demencije**

### **1.1.1 Osnovne informacije o demenciji i podaci o zastupljenosti**

Demencija je sindrom karakteriziran progresivnim gubitkom kognitivnih sposobnosti koji rezultira gubitkom pamćenja, nemogućnošću racionalnog razmišljanja i donošenja odluka, promjenom ponašanja i nesposobnošću provođenja svakodnevnih aktivnosti (1). Bolest pogađa stariju populaciju i predstavlja veliki izazov globalnom programu zdravstvene zaštite obzirom na rastući udio osoba starijih od 60 godina (2).

Prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije (engl. World Health Organization, WHO), na svijetu je 47,5 milijuna osoba sa dijagnozom demencije. Predviđa se da će do 2030. godine taj broj narasti na 75,6 milijuna, a do 2050. godine broj slučajeva demencije bi mogao biti 135,5 milijuna. Među pogođenim osobama, 58% ih živi u zemljama s nižim ili srednjim prihodima, a predviđa se da će se ovaj udio do 2050. godine povećati na 71% (3).

Demencija predstavlja veliki socio-ekonomski problem za cjelokupnu zajednicu obzirom na činjenicu da oboljeli treba konstantnu pomoć i njegu (4). U Hrvatskoj je popisom stanovništva u 2011. godini utvrđeno da su žene zastupljenije u starijoj populaciji, dok je u 2013. godini stopa hospitalizacija za skupinu bolesti kojima pripada demencija bila gotovo podjednaka za muškarce i žene.

U Hrvatskoj ne postoji nacionalni registar oboljelih od demencije. Uzevši u obzir visok postotak stare populacije, procjenjuje se da u Hrvatskoj živi približno 80.000 osoba pogođenih demencijom. Pretpostavlja se da od tog broja, 15.000 oboljelih živi na širem području grada Zagreba (5).

## **1.2 Funkcija pamćenja**

Kognitivna sposobnost koja je najčešće pogođena kod demencije je pamćenje. Pamćenje je složena kognitivna sposobnost pomoću koje se pohranjuju i, po potrebi, dohvaćaju razni podaci (6). Dijeli se na deklarativno koje je karakterizirano svjesnim i namjernim prisjećanjem i nedeklarativno (implicitno, proceduralno) koje uključuje učenje percepcijskih, kognitivnih i

motornih vještina i primjenu tih vještina koje s vremenom može postati automatsko i ne mora zahtijevati svjesno prisjećanje podataka (6).

Obzirom na trajanje, pamćenje se dijeli na radno, kratkotrajno i dugotrajno pamćenje (6). Radno pamćenje traje manje od minute i zahtjeva pažnju i vigilnost, a poremećaji su vezani uz prefrontalni korteks (6). Kratkotrajno pamćenje traje od nekoliko minuta do nekoliko mjeseci i za njegovo funkcioniranje je zadužen u prvom redu hipokampus. Dugotrajno pamćenje je zaduženo za pohranu informacija od nekoliko tjedana, pa i doživotno.

### 1.3 Podjela demencija

Demencije mogu biti uzrokovane patološkim promjenama u moždanom tkivu, ali i vanjskim i metaboličkim uzrocima (7). Obzirom na mogućnost oporavka dijele se na potencijalno reverzibilne i ireverzibilne (progresivne, degenerativne) (6). Potencijalno reverzibilne demencije većinom pripadaju skupini demencija s vanjskim i metaboličkim uzrokom. Obzirom na regije mozga zahvaćene promjenama u početnim stadijima, demencije se dijele na: kortikalne (Alzheimerova bolest (engl. Alzheimer's disease, AD), frontotemporalna demencija, Pickova bolest, itd.) karakterizirane gubitkom kortikalnih funkcija, pamćenja i nemogućnošću obavljanja svakodnevnih aktivnosti; subkortikalne (nastaju kao jedan od simptoma bolesti kao što su Huntingtonova i Parkinsonova bolest, multipla skleroza itd.) čije su značajke usporenje mentalnih procesa i oštećenje proceduralnog pamćenja; miješane demencije koje su kombinacija gubitka kortikalnih i subkortikalnih funkcija, poput demencije s Lewyevim tjelešcima. Prema vrsti proteina koji se patološki nakupljaju, demencije se dijele na: amiloidopatije (AD); tauopatije (kod kortikobazalne i frontotemporalne demencije dolazi do nakupljanja **tau** proteina, ali i za AD je, osim nakupljanja amiloida  $\beta$  karakteristično i nakupljanje **tau** proteina) i sinukleionopatije (nakupljanje  $\alpha$ -sinukleina je značajka demencije s Lewyevim tjelešcima i Parkinsonove bolesti). Demencija koja nastaje kao posljedica cerebrovaskularnih bolesti je vaskularna demencija (VAD). Najčešće demencije su AD i VAD, od kojih na AD otpada 60-70% slučajeva demencije (4), a na VAD 20% slučajeva (8).

## 1.4 Dijagnostički kriteriji

### 1.4.1 Alzheimerova bolest

Veliku zapreku pouzdanom dijagnosticiranju AD predstavljaju brojni komorbiditeti u starijoj populaciji i nemogućnost realne procjene stanja zbog nepoznavanja premorbidne razine kognitivnih sposobnosti bolesnika (9). Najčešće korišteni kriteriji za dijagnosticiranje AD su oni koje preporučuje NINCDS-ADRDA (engl. National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association, revidirani kriteriji 2011). Kliničko-patološka istraživanja točnosti NINCDS-ADRDA kriterija u dijagnostici vjerojatne AD pokazala su osjetljivost od 81% i specifičnost od 70% (9, 10). Ključni kriteriji za dijagnozu AD su kognitivni ili neuropsihijatrijski simptomi koji se manifestiraju kao nemogućnost obavljanja poslova i uobičajenih aktivnosti koja se primjećuje kao propadanje u odnosu na prijašnje funkcioniranje i nisu nastali kao posljedica delirija ili psihijatrijskog poremećaja ili kognitivni poremećaj koji je otkriven putem uzimanja povijesti bolesti od samog bolesnika ili bolesniku bliske osobe i objektivne procjene putem neuropsihološkog testiranja. Kognitivni poremećaj ili poremećaj ponašanja uključuje barem dva od sljedećih područja: poremećena sposobnost osobe da usvoji i prisjeti se nove informacije; poremećeno rasuđivanje i izvođenje kompliciranih zadataka, slabo procjenjivanje; poremećene vizuospacijalne sposobnosti; poremećene jezične sposobnosti (govor, čitanje, pisanje) i promjene u osobnosti i ponašanju. U istom dokumentu, McKhann i suradnici su predložili klasifikacijske kriterije za AD: 1) Vjerojatna (engl. probable) AD čije je obilježje podmuklo nastajanje sa simptomima koji se očituju temeljem povijesti bolesti i pregleda; 2) Moguća (engl. possible) AD koja je karakterizirana atipičnim tijekom ili etiološki miješanom slikom; 3) Vjerojatna ili moguća AD s dokazanim patofiziološkim procesom karakterističnim za AD (preporučeno korištenje samo u istraživačke svrhe).

Vjerojatna AD s dokazanim patofiziološkim procesom karakterističnim za AD uključuje slijedeće biokemijske biljege patofiziološkog procesa AD:

- Biljezi deponiranja amiloid- $\beta$  (A $\beta$ ) proteina u mozgu - niska koncentracija A $\beta$ 42 u likvoru i pozitivni nalaz PET-a (engl. positron emission tomography). PET koristi spojeve pomoću kojih je moguće *in vivo* obilježiti amiloidne plakove. Pozitivni nalaz PET-a označava povećanje retencije biljega amiloidnih plakova kod bolesnika s AD u odnosu na kognitivno zdrave osobe.

- Biljezi neuronske degeneracije ili ozljede - povišena koncentracija likvorskog **tau** proteina, tj. ukupnog i fosforiliranog **tau** (**p-tau**) proteina, smanjena apsorpcija <sup>18</sup>fluorodeoksiglukoze na PET-u u predjelu sljepoočno-tjemenog korteksa i nerazmjerna atrofija kod strukturne nuklearno magnetske rezonancije (NMR) u predjelu medijalnog, bazalnog i lateralnog sljepoočnog režnja te medijalnog tjemenog korteksa.

Korištenje biokemijskih biljega AD-a u svrhu rutinskih dijagnostičkih postupaka se ne preporučuje jer su ključni klinički kriteriji dovoljno točni i korisni za većinu bolesnika, ne postoji dovoljno rezultata istraživanja temeljenih na dokazima koja će osigurati korištenje kriterija koji uključuju biokemijske biljege, metode za određivanje biljega nisu standardizirane i korištenje biljega nije dostupno u svim okolnostima.

#### **1.4.2 Vaskularna demencija**

Pod pojmom VAD podrazumijeva se poremećaj kognitivnih funkcija nastao uslijed cerebrovaskularne bolesti. Uzroci cerebrovaskularne bolesti mogu biti ishemijski ili hemoragijski moždani udar i mikroskopski kortikalni infarkti. Infarkti bijele tvari mogu nastati i kao posljedica srčanih i cirkulacijskih bolesti (8). Za uspostavljanje dijagnoze VAD, nužno je da budu zadovoljena sljedeća tri osnovna preduvjeta: kognitivni poremećaj (najčešće u području izvršnog funkcioniranja), cerebrovaskularna bolest i pojava kognitivnog poremećaja unutar tri mjeseca nakon cerebrovaskularne bolesti (11). Kriteriji za kliničku dijagnozu vjerojatne VAD, prema radnoj skupini National Institute for Neurological Disorders and Stroke i Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences (NINDS - AIREN) (12), obuhvaćaju sljedeće: 1) demencija s oštećenjem pamćenja u dva ili više kognitivnih područja koja je dokazana neuropsihološkim testiranjem i pregledom; 2) kliničkim pregledom utvrđeni fokalni neurološki deficiti koji su karakteristični za cerebrovaskularnu bolest (hemipareza, smanjena vidna sposobnost, poremećaj artikuliranja govora i deficit osjeta) uz dokaz o postojanju cerebrovaskularne bolesti pomoću slikovnih tehnika kao što su CT (kompjuterizirana tomografija) ili MR (magnetska rezonancija) i 3) izrazite i nagle promjene u kognitivnim funkcijama karakteristične za VAD.

Jedan od oblika VAD je multiinfarktna demencija koja se razvija kao posljedica nekoliko moždanih udara. Obilježja multiinfarktne demencije su nalaz višestrukih područja infarkta dobiven slikovnom tehnikom, prisutnost rizičnih čimbenika za cerebrovaskularnu bolest i fokalni neurološki deficiti (hemipareza, pseudobulbarna pareza, itd.). Ponekad je teško

razlikovati AD od multiinfarktne demencije, jer se starenjem nakupljaju amiloidi na stijenkama krvnih žila i dovode do hemoragijskog ili ishemijskog moždanog udara. U takvim slučajevima je moguće neurosonološkim tehnikama utvrditi prisutnost embolije, najčešće u području srednje moždane arterije, što je obilježje multiinfarktne demencije. Kod VAD će poremećeni protok krvi i nemogućnost eliminiranja  $A\beta$  iz vanstaničnog prostora dovesti do napredovanja AD.

### **1.4.3 Blagi kognitivni poremećaj**

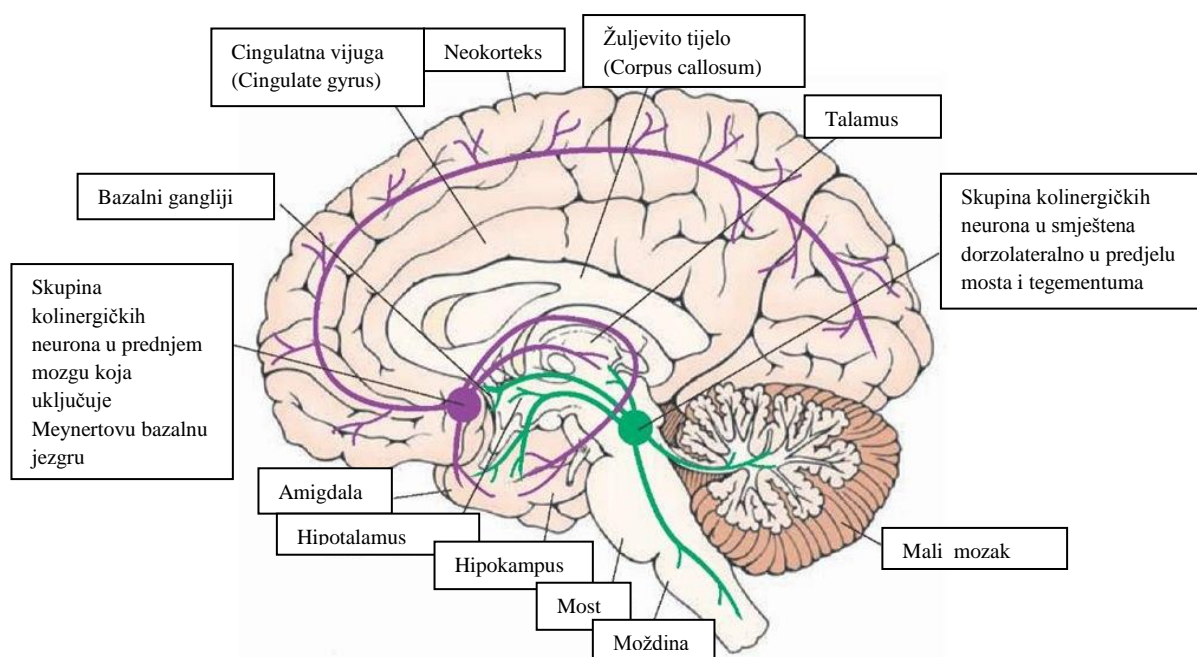
Pod pojmom blagi kognitivni poremećaj (engl. mild cognitive impairment, MCI) danas se podrazumijeva cijeli niz kliničkih entiteta koji su karakterizirani blagim poremećajem kognitivnih funkcija i koji su uzrokovani raznim stanjima (degenerativna, vaskularna, metabolička demencija, demencija uslijed traume). Tijekom starenja se postupno smanjuje sposobnost pamćenja. Ukoliko je taj deficit izraženiji u odnosu na prosjek, tada se može govoriti o blagom kognitivnom poremećaju. Kod osoba starijih od 65 godina prevalencija blagog kognitivnog poremećaja se kreće od 3-19%. Na godišnjoj razini će kod 5-10% osoba koje imaju dijagnosticiran blagi kognitivni poremećaj doći do pojave jasne demencije. Kriteriji za postavljanje dijagnoze blagog kognitivnog poremećaja uključuju: 1) propadanje kognitivnih funkcija u odnosu na prethodno funkcioniranje bolesnika koje obično primjećuju osobe bliske bolesniku; 2) kod pogođenih osoba rezultati neuropsiholoških testova imaju vrijednosti niže za 1 do 1,5 standardnih devijacija, u odnosu na očekivane vrijednosti za dob i razinu edukacije i 3) održana sposobnost funkcioniranja u svakodnevnim aktivnostima – iako su samostalni, bolesnici funkcioniraju usporeno i otežano.

Razlikuje se nekoliko vrsta blagog kognitivnog poremećaja: amnestički je karakteriziran isključivo poremećajem memorije, dok su kod neamnestičkog blagog kognitivnog poremećaja pogođena druga područja, poput pažnje, govora ili vizuospacijalnih funkcija. Amnestički oblik najčešće prelazi u AD, dok neamnestički oblici prelaze u frontotemporalnu demenciju ili demenciju s Lewyjevima tjelešcima (13).

## 1.5 Patofiziologija i etiologija Alzheimerove bolesti i vaskularne demencije

### 1.5.1 Molekularni mehanizmi nastanka senilnih plakova i neurofibrilarnih čvorova

Definitivna dijagnoza AD potvrđuje se *post mortem* patološkim nalazom difuzne atrofije moždane kore sa sekundarnim proširenjem ventrikularnog sustava. Mikroskopskim pregledom nalaze se amiloidni plakovi koji sadrže **Aβ** i neurofibrilarni čvorovi. Amiloid se deponira u moždanom parenhimu u obliku difuznih plakova i gustih ili neuritičkih plakova. Promjene su najzastupljenije u hipokampusu, sljepoočnom korteksu i Meynertovoj bazalnoj jezgri (Slika 1). Fiziološki se tijekom procesa starenja stvaraju amiloidni plakovi i neurofibrilarni čvorovi, međutim, u AD se stvaraju u znatno većim količinama (6).



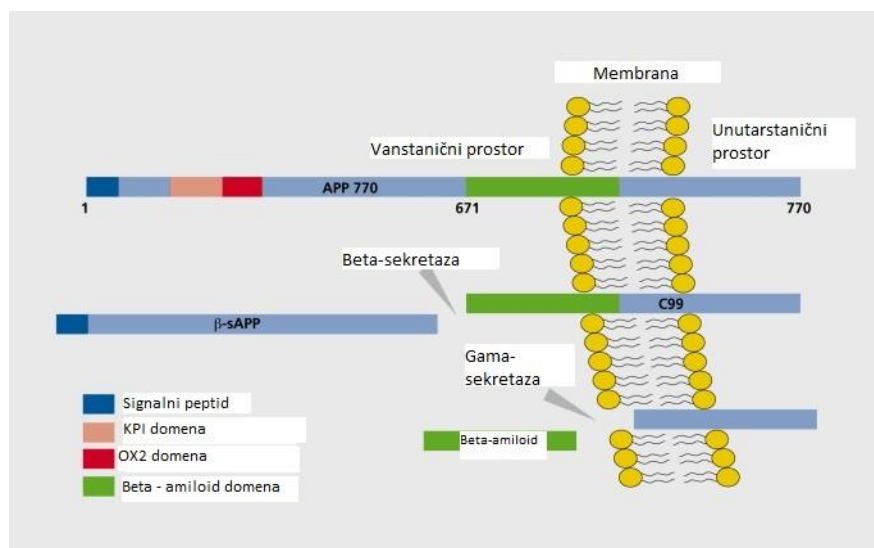
Slika 1. Prikaz hipokampusa i bazalne Meynertove jezgre

(Prema: <https://neuroamer.wordpress.com/2014/10/07/the-coming-alzheimers-epidemic-and-the-cholinergic-hypothesis/>)

Iako se smatra da patofiziološka osnova nastanka AD leži u nakupljanju **Aβ** i **tau** proteina, danas postoje saznanja da je u neurodegenerativni proces uključen i cijeli niz drugih čimbenika,



poput genskih i okolišnih, zatim oksidativnog stresa, upale i poremećaja na nivou mitohondrija (9). Kumulativnim djelovanjem svih čimbenika kroz period od 20 – 30 godina dolazi do konačne degeneracije neurona i sinapsi. Hipoteza amiloidne kaskade je temeljena na promjenama u metabolizmu **Aβ**42 zbog čega dolazi do prekomjerenog nastajanja, smanjenog klirensa i/ili povećanog agregiranja **Aβ**42. Takvi procesi rezultiraju nastajanjem difuznih plakova koji djeluju na sinapse i uzrokuju aktiviranje astrocita i pokretanje upalnih procesa. Na mjestu plakova i upalne reakcije dolazi do ozljede tkiva i oksidativnog stresa koji rezultiraju opsežnim oštećenjem neurona i pojavom demencije (14). **Aβ**, glavni sastojak amiloidnih plakova, nastaje proteolitičkim cijepanjem amiloidnog prekursorskog proteina (APP). APP je membranski protein sastavljen od 770 aminokiselina koji se sastoji od velike izvanstanične N-terminalne domene i manjeg unutarstaničnog (citoplazmatskog) repa. Niz kaskadnih reakcija započinje cijepanjem APP na poziciji 671 pomoću proteaze β-sekretaze ili BACE 1 (engl. β-site APP-cleaving enzyme) čime nastaje produkt nazvan βsAPP (engl. β-secretase-cleaved soluble APP) (Slika 2). Ostatni C-terminalni fragment (CTF) APP-a koji se sastoji od 99 aminokiselina (C99) pod djelovanjem γ-sekretaze pretvara se u slobodni **Aβ**. Postoji nekoliko C-terminalnih oblika **Aβ**: **Aβ**42 koji završava s alaninom i **Aβ**40. Utvrđeno je da **Aβ**42 ima veću sklonost agregiranju i da je veći dio plakova sastavljen upravo od ovog oblika.



Slika 2. Shematski prikaz nastanka **Aβ** iz APP (KPI: engl. Kunitz protease inhibitor) (Prema: Hampel H, Blennow K. CSF **tau** and β-amyloid as biomarkers for mild cognitive impairment. Dialogues Clin Neurosci 2004;6;379-90.)

Mikrotubularni protein koji se nalazi na aksonima neurona i koji vezivanjem za tubulin osigurava stabilnost mikrotubula se naziva **tau** protein. **Tau** protein postoji u šest izoformi koje se sastoje od 352 do 441 aminokiseline, čija je molekularna težina od 50 do 65 kDa. Mjesta za fosforilaciju **tau** proteina nalaze se na treoninskim ili serinskim pozicijama. Upravo zbog hiperfosforiliranja, **tau** protein se ne može vezati za mikrotubule, agregira se i formira neurofibrilarne čvorove u AD (15). Hipoteza „amiloidne kaskade“ utemeljena je na postojanju sporadičnog (kasnog) i obiteljskog (ranog, engl. early onset Alzheimer's disease, EOAD) oblika AD. Kod obiteljskog oblika bolesti dolazi do mutacija na genima koji kodiraju proteine uključene u kaskadu (amiloidni prekursorski protein i enzime sekretaze). Radi se o autosomno dominantnim mutacijama na genu za APP (frekvencija 16% u EOAD) i genima za presenilin PSEN-1 i PSEN-2. Kod PSEN-1 mutacije AD se pojavljuje u dobi od 25 do 65 godina, a kod PSEN-2 pojava bolesti je kasnija, od 45 do 88 godine (9). Točkaste mutacije u genu za APP na kromosomu 21 dovode do ranog oblika obiteljske AD. Kod odraslih osoba s trisomijom 21, tj. Downovim sindromom razvija se demencija s neuropatološkim promjenama tipičnim za AD. Gen za presenilin-1 se nalazi na kromosomu 14, a gen za presenilin-2 se nalazi na kromosomu 1 i kodiraju citoplazmatske proteine koji su uključeni u razgradnju APP (6). Kod polimorfizma jednog nukleotida na genu za APP na poziciji 673 dolazi do zamjene alanina za treonin. Takva mutacija djeluje neuroprotektivno, jer je ispitivanjima na humanim staničnim linijama s tom mutacijom nađena manja koncentracija **Aβ**, a u skupini kognitivno zdravih ispitanika nađena je značajno veća prevalencija upravo te mutacije u odnosu na skupinu oboljelih od AD. Unutar populacije kognitivno zdravih ispitanika, nositelji neuroprotektivnog polimorfizma su imali bolje rezultate kognitivnih testova. Terapeutske strategije su usmjerene na smanjenje mase **Aβ** u moždanom tkivu inhibiranjem njegove sinteze (14). Novija istraživanja patofizioloških procesa u neurodegenerativnim bolestima ukazuju na ulogu tzv. lipidnih nakupina (engl. lipid raft). Lipidne nakupine su heterogena, visoko-dinamična područja, veličine od 10-200 nm, bogata sterolima i sfingolipidima, smještene u membrani. Preživljavanje neurona je ovisno o procesu autofagije koji se sastoji od preslagivanja membrane i obuhvaćanja proteinskog kompleksa, tj. nastajanja autofagosoma, spajanja autofagosoma s lizosomom i razgradnje. PSEN-1 je uključen u proces autofagije i promjene sadržaja lipidnih nakupina prisutnih u membrani neurona. Pretpostavlja se da lipidne nakupine blokiraju lizosomski sustav koji je uključen u obradu amiloidnog prekursorskog proteina i razgradnju **Aβ**. Vezanjem **Aβ** za lipidne nakupine inducira se formiranje amiloidnih oligomera i fibrila (16). Ispitivanja povezanosti veličine plakova i neurofibrilarnih čvorova sa stupnjem jačine demencije ukazuju na

potencijalni neurotoksični učinak oligomera **Aβ** koji bi mogao imati daleko veću ulogu u nastanku kognitivnog propadanja i gubitka pamćenja. Istraživanja na animalnim modelima pokazala su da solubilni **Aβ** oligomeri, koji se također nazivaju i **Aβ**-derivirani difuzibilni ligandi (engl. **Aβ**-derived diffusible ligands, ADDL) potiču prekomjernu stimulaciju ekstrasinaptičkih N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora čime se mijenjaju redukcijско-oksidacijski procesi i reguliranje  $Ca^{2+}$ . Aktiviraju se signalni putevi i pokreću kaskade koje za posljedicu imaju kidanje sinapsi i gubitak neurona. Cijeli niz proteina posreduje u ovom složenom procesu npr. engl.  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors ( $\alpha 7nAChRs$ ), mGluR5, neurotrophin receptor p75NTR, cellular prion protein (PrPC), PSD-95, glutamate transporter, ephrin type-B receptor 2 (EphB2) i ephrin type-A receptor 4 (EphA4). Poremećaj u funkciji sinapsi uzrokovan s **Aβ** dovodi do povećanja koncentracije kalcija u citoplazmi. Kalcineurin je proteinska fosfataza ovisna o kalciju koja utječe na aktiviranje i deaktiviranje nekoliko signalnih puteva. Promjene u aktiviranju signalnih puteva rezultiraju hiperfosforiliranjem **tau** proteina. Povećane koncentracije **Aβ** oligomera smanjuju količinu transportera glutamata i onemogućavaju njegov normalan unos u glija stanice. Prekomjerno aktiviranje receptora NMDA je uzrokovano zadržavanjem glutamata u ekstrasinaptičkom prostoru. U astrocitima **Aβ** oligomeri povećavaju otpuštanje glutamata u ekstrasinaptički prostor. Izlaganjem postsinaptičkog građevnog proteina, PSD-95 djelovanju **Aβ** oligomera, onemogućeno je normalno sklapanje proteina i neuroplastičnost. Osim djelovanja putem receptora NMDA, dokazano je da se **Aβ** veže za p75 neurotrofni receptor i na taj način može izazvati apoptozu. Na sinaptičku aktivnost dodatno utječu i receptori za inzulin i inzulinu sličan čimbenik rasta. Unutarstanični oligomeri **Aβ** sprječavaju prijenos signala inzulinskog receptora, dok vanstanični oligomeri **Aβ** mogu potaknuti gubitak inzulinskih receptora. Sinaptički mitohondriji su osjetljivi na djelovanje **Aβ** što rezultira njihovom fragmentacijom i gubitkom funkcije (17). Genskim čimbenikom rizika za razvoj AD s kasnim početkom (engl. late onset Alzheimer's dementia, LOAD) smatra se alel ApoE4 gena na kromosomu 19. Istraživanja genske povezanosti (engl. genome wide association study, GWAS) su otkrila cijeli niz drugih gena, od kojih se ističu tri: CR1, **CLU** i PICALM (18), međutim jedino za alel ApoE4 postoje pouzdani dokazi temeljeni na nizu istraživanja. ApoE je glikoprotein kojeg u mozgu sintetiziraju uglavnom neuroni i astrociti i koji ima ulogu u procesu mobilizacije i preraspodjele kolesterola u periferiji, te u procesu rasta i zacjeljivanja neurona. Osim u regeneraciji živčanog tkiva, ApoE sudjeluje u imunoregulaciji i aktiviranju enzima koji sudjeluju u lipolizi. Postoje tri glavne izoforme ApoE – ApoE2, ApoE3 i ApoE4, od kojih je alel za ApoE4 ( $\epsilon 4$ ) povezan s

obiteljskim i sporadičnim oblicima AD i smatra se čimbenikom rizika za razvoj te bolesti. Izoforma ApoE4 se brže veže za **Aβ** od izoforme ApoE3 i na taj način se brže stvaraju plakovi (19). **CLU** gen kodira lipoprotein J, odnosno klasterin (engl. clusterin) koji sudjeluje u cijelom nizu fizioloških procesa poput upalnog odgovora, reagiranjem s komponentama komplemента tzv. MAC (engl. membrane attack complex) kompleksa, zatim u apoptozi, prometu sinapsi, itd. **PICALM** gen kodira protein (engl. phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein), koji se naziva i **CALM** (engl. clathrin assembly lymphoid-myeloid leukemia). Utvrđeno je da je gen povezan s leukemijama, ali protein kojeg kodira je u visokoj koncentraciji prisutan u neuronima. Protein je uključen u endocitozu posredovanu klatrinom koja je neophodna za promet lipida i proteina i promet sinapsi. Gen **CR1** kodira membranske glikoproteine koji se nalaze na krvnim stanicama i folikularnim dendritičnim stanicama slezene i posreduje u vezanju stanica za imune komplekse i čestice koje su aktivirale komponente komplemента. Pretpostavlja se da u ranoj fazi formiranja mikrofibrila **Aβ** proteini vezani uz aktiviranje komplemента imaju pozitivnu ulogu jer omogućavaju eliminaciju mikrofibrila. Međutim, u uznapređovaloj fazi nastajanja plakova, dolazi do kompletne aktivacije komplemента, te do izražaja negativnih učinaka upale i nastupa neurodegeneracija (19). Vaskularni čimbenici povezani s novootkrivenim genima koji kodiraju proteine uključene u nastanak AD su hipertenzija (**ACE** gen), pretilost i hiperkolesterolemija. Patofiziološka etiologija AD povezuje se s fenomenom ekscitotoksičnosti, koji podrazumijeva prekomjernu ekscitiranost neurona visokim koncentracijama glutamata koje dovode do smrti neurona (20). Prekomjerna stimulacija receptora, u prvom redu **NMDA**, dovodi do ulaska kalcija u stanicu i nastanka slobodnih radikala, poremećaja funkcije mitohondrija, aktiviranja signalnih puteva i enzima ovisnih o kalciju. Dokazano je da su aktivnosti mitohondrijske citokrom c oksidaze i citokrom c reduktaze znatno smanjene kod AD. U eksperimentalnom modelu sinaptosoma inhibirana je aktivnost citokrom c reduktaze za 60-90%. Inhibicija je uzrokovala otpuštanje glutamata iz sinaptosoma i ekscitotoksičnu staničnu smrt. Citosolni enzim fosfolipaza A2 u astrocitima pod kontrolom je unutarstaničnih signalnih puteva i aktivira se pomoću mitogenom aktivirane protein kinaze (**MAPK**) i protein kinaze C (**PKC**). Neregularna aktivnost neuronske citosolne fosfolipaze A2 povezuje se s oksidativnim signalnim putevima koji uključuju **NADPH** oksidazu. Slobodni radikali nastaju djelovanjem **NADPH** oksidaze koja prenosi elektrone i veže ih za molekularni kisik. Nastali toksični produkti vežu se za membranske proteine, čime se onemogućava normalni transport iona i proizvodnja energije. Uslijed visoke koncentracije glutamata, u astrocitima, oligodendrocitima i mikroglija stanicama dolazi do pada koncentracije

glutaciona, zbog čega ove stanice postaju osjetljivije na štetno djelovanje slobodnih radikala. Pretpostavlja se da kombinacija ekscitotoksičnosti, slobodnih radikala, neuroinflamatornog stanja, te povećane koncentracije razgradnih produkata fosfolipida, sfingolipida i kolesterola dovode do propadanja sinapsi u AD.

### **1.5.2 Etiologija i patološki entiteti koji dovode do vaskularne demencije**

Vaskularna demencija nastaje kao posljedica cerebrovaskularne bolesti, u prvom redu moždanog udara. Starenjem se na stjenkama krvnih žila nakuplja amiloid, što u nekim slučajevima može dovesti do nastanka amiloidne angiopatije. Takvo stanje može uzrokovati hemoragijski ili ishemijski moždani udar, što pokazuje kompleksnost patobiokemijske podloge demencije koja se ne može strogo podijeliti na AD i VAD, već se treba promatrati kao sindrom čije se etiologije preklapaju (6). Smatra se da 20-30 % pacijenata koji zadovoljavaju kriterije za VAD ima istodobno i patološku podlogu karakterističnu za AD (21). Uz ishemijsku ili hemoragijsku vaskularnu leziju, u VAD se ubrajaju i Binswangerova bolest i cerebralna autosomno dominantna arteriopatija sa subkortikalnim infarktima i leukoencefalopatijom (CADASIL). U Binswangerovoj bolesti dolazi do multiplih lakunarnih infarkta koji su povezani s demijelinizacijskim promjenama u bijeloj tvari. CADASIL je dominantno nasljedni poremećaj karakteriziran gubitkom bijele tvari kod kojeg oštećenja mitohondrija imaju za posljedicu promjene u bazalnim ganglijima ili korteksu. Simptomi koji se manifestiraju su slični onima kod moždanog udara (8,11). Cerebrovaskularne bolesti povezane su s kardiovaskularnim čimbenicima rizika: šećernom bolešću tipa 2, hipertenzijom, visokom koncentracijom LDL-kolesterola i upalom. Bolesnici sa šećernom bolešću tipa 2 imaju mikro- i makro-vaskularne promjene, promjene u signalnim putovima inzulinskih receptora u središnjem živčanom sustavu i povećanu koncentraciju produkata glikacije (engl. advanced glycation end products, AGE). Takve promjene uzrokuju poremećaj u moždanom energetskeg metabolizmu, neuroprotektivnim funkcijama i neuroplastičnosti (22). Nuspojava inzulinske terapije, hipoglikemija, povezana je s oštećenjem neurona. Animalni eksperimentalni modeli i istraživanja na staničnim kulturama sastavljenim od neurona i glija stanica pokazali su da je sinteza superoksida povećana kod reperfuzije glukoze, a ne same hipoglikemije. Reaktivni superoksid nastaje aktiviranjem NADPH oksidaze. Istraživanja koja su provedena upotrebom neuroloških slikovnih tehnika pokazala su brojne strukturne, funkcionalne i metaboličke promjene u moždanom tkivu pacijenata sa šećernom bolešću tipa 2. Strukturne promjene obuhvaćaju atrofiju mozga i povećanje ventrikula, dok su funkcionalne promjene izražene u

smanjenoj povezanosti hipokampusa s ostalim regijama mozga. Metaboličke promjene u mozgu detektirane spektroskopijom magnetske rezonancije (engl. magnetic resonance spectroscopy, MRS) ukazuju na značajno smanjenje koncentracije glutamina i glutamata u subkortikalnoj regiji (23).

## **1.6 Preventivne mjere i terapijska sredstva**

Čimbenici rizika za razvoj demencije su životna dob, vaskularni čimbenici rizika, oboljenja povezana s patološkim promjenama na krvnim žilama (šećerna bolest, hipertenzija, i sl.) i brojni psihosocijalni čimbenici. Strategija djelovanja protiv demencija, u prvom redu AD, je podijeljena na primarnu (djelovanje na etiološke čimbenike), sekundarnu (rano otkrivanje) i tercijarnu prevenciju (primjena terapijskih sredstava) (24). Dokazano je da intervencije u više područja mogu poboljšati ili održavati kognitivne sposobnosti starije populacije na istoj razini (25). Sekundarna prevencija uključuje uvođenje MCI kao posebne kategorije, koje ipak nije dalo zadovoljavajuće rezultate zbog izrazite heterogenosti dijagnoza kojima može voditi takav poremećaj. U svrhu što ranije dijagnostike demencija provode se intenzivna istraživanja biljega u serumu i likvoru i usavršavaju se slikovne tehnike (24). Tercijarna prevencija obuhvaća terapiju koja ublažava simptome demencija. Danas se koriste inhibitori kolinesteraze (donepezil, rivastigmin, galantamin) i antagonisti NMDA receptora (memantin). Lijekovi usporavaju kognitivno propadanje. Za skupinu pacijenata s blagim do umjerenim simptomima demencije primjenjuju se lijekovi iz skupine inhibitora kolinesteraze, a za bolesnike s umjerenim do teškim stupnjem demencije koristi se memantin (9). Cijeli niz istraživanja se provodi u svrhu pronalaska učinkovite terapije koja će djelovati na uzrok demencije. Istraživanja BACE1 inhibitora usmjereno je na sprječavanje nastanka amiloidnih plakova. Nedostaci BACE1 inhibitora su štetne nuspojave i nemogućnost djelovanja na već formirane plakove (14).

## **1.7 Klinička i laboratorijska dijagnostika demencija**

### **1.7.1 Neurološki pregled, neuropsihološki testovi i slikovne tehnike**

Visoki stupanj točnosti dijagnoze AD može se postići samo u ustanovama u kojima rade stručnjaci fokusirani isključivo na dijagnosticiranje te bolesti. Obzirom da je populacija kojoj se radi obrada starija, postoji cijeli niz drugih patoloških stanja koja mogu otežati postavljanje

dijagnoze. Isto tako, kliničaru je teško procijeniti razinu oštećenja kognitivnih funkcija, jer nije upoznat sa stanjem bolesnika prije primjećivanja promjena (9). Pregled obuhvaća detaljno prikupljanje podataka o čimbenicima rizika za razvoj demencije i opis simptoma. Preporuka je da se podaci uzimaju od bolesnika i bliske osobe. Neuropsihološki testovi obuhvaćaju u prvom redu testiranje epizodičnog pamćenja, jer je ono pogođeno već u ranim fazama AD. MMSE (engl. Mini-Mental State Examination) je test koji se sastoji od pitanja kojima se kod bolesnika ispituju sposobnosti iz sljedećih područja: vizualno-spacijalne sposobnosti, pamćenje, orijentacija u vremenu i prostoru, brojanje, pozornost, jezične funkcije, ponavljanje, opoziv, izvršavanje pisanih ili usmenih naredbi (26). Dok se MMSE smatra općim testom za demenciju, noviji test MoCA (engl. Montreal Cognitive Assessment) se smatra osjetljivijim za blagi kognitivni poremećaj (27). To je kratki i jednostavni test koji ispituje ukupno 8 kognitivnih područja. Bolesniku koji se javi liječniku radi kognitivnih smetnji uputno je najprije učiniti MMSE, te ukoliko je rezultat u granicama normale, učiniti i MoCA test radi detekcije potencijalnog blagog kognitivnog poremećaja (28). U dijagnostici AD i ostalih vrsta demencije koriste se kompjutorizirana tomografija (CT) i magnetska rezonancija (MR). Magnetska rezonancija je znatno osjetljivija u detekciji vaskularnih promjena i lokalizirane atrofije. Pomoću novih tehnika kao što je PET moguće je procijeniti metabolizam glukoze u mozgu i amiloidne plakove (9). U diferencijalnoj dijagnostici demencija, posebno u diferenciranju AD od vaskularne i frontotemporalne demencije, visoku osjetljivost i specifičnost su pokazale PET i SPECT (engl. single-photon emission computed tomography) (29). Postupak obrade bolesnika za koje se sumnja da imaju neki oblik demencije obuhvaća i ultrazvučnu procjenu debljine intimalnog i medijalnog dijela stijenke karotidne arterije (engl. intima-media thickness, IMT). IMT se smatra nadomjesnim biljekom ateroskleroze (30). BHI (engl. breath holding index) je također često upotrebljavani test u kliničkoj praksi koji služi za procjenu moždane autoregulacije (31). Temelji se na vazodilatacijskoj reakciji koja nastaje uslijed povećanja CO<sub>2</sub> u krvi koji je izazvan zaustavljanjem daha.

### **1.7.2 Laboratorijska dijagnostika**

Laboratorijska obrada pacijenata s demencijom uključuje kompletnu krvnu sliku, bubrežne i jetrene testove, koncentraciju vitamina B12 i folne kiseline u serumu, hormona štitnjače, kalcija i glukoze (9). Osim toga, lipidni status, koncentracija mokraćne kiseline i C-reaktivnog proteina (CRP) se određuju za procjenu aterosklerotskog rizika i praćenje terapije statinima u populaciji bolesnika s moždanim udarom u osobnoj anamnezi. Ukoliko postoji sumnja u infektivnu

etiologiju demencije, provodi se i serološko testiranje na HIV (engl. human immunodeficiency virus), boreliozu i lues.

## **1.8 Biokemijski biljezi demencije**

### **1.8.1 Definicija biljega**

Idealan biljeg koji bi se mogao upotrebljavati u svakoj fazi bolesti, kako u ranoj dijagnostici, tako i u praćenju učinkovitosti terapijskih postupaka trebao bi zadovoljavati sljedeće kriterije: trebao bi odražavati patofiziološki proces koji uzrokuje bolest, može se mjeriti u bilo kojoj fazi bolesti, postoji automatizirana metoda kojom se biljeg može pouzdano odrediti, pouzdano može pratiti tijek bolesti i odgovor na primijenjene terapijske postupke (32). AD je karakterizirana patofiziološkim promjenama koje su prisutne godinama prije manifestiranja prvih simptoma i sporim kliničkim tijekom, što znatno otežava mogućnost pronalaska idealnog biljega koji će zadovoljiti sve gore navedene kriterije. Za pravodobno dijagnosticiranje MCI, VAD i AD, nužno je kombiniranje dostupnih dijagnostičkih alata s potencijalnim biljezima.

### **1.8.2 Amiloid $\beta$ 42, tau protein, fosforilirani tau protein**

Revizija NINCDS – ADRDA kriterija za AD iz 2011. godine uključila je, temeljem do tada objavljenih dokaza, **A $\beta$**  i **tau** protein u likvoru u biljege koji se mogu koristiti u istraživačke svrhe. Kod bolesnika s dijagnozom AD koncentracija **A $\beta$**  u likvoru je za 50% niža od koncentracije kod zdravih ispitanika, dok koncentracija ukupnog **tau** proteina može biti i trostruko veća od one koja se nalazi u zdravoj populaciji. Fosforilirani **tau** protein se koristi u diferencijalnoj dijagnostici AD od drugih stanja (encefalitisa, moždanog udara, Creutzfeldt-Jakobove bolesti) praćenih visokom koncentracijom ukupnog **tau** proteina (33). Razvojem tehnike tekućinske kromatografije i masene spektrometrije znanstvenici su identificirali cijeli niz likvorskih proteina čija je ekspresija kod AD promijenjena u odnosu na zdravu populaciju (33). Ispitivanja biokemijskih biljega za AD u krvi nisu dala konzistentne rezultate. Određivanje koncentracije **A $\beta$**  42 i 40 u plazmi dala su kontradiktorne rezultate u različitim istraživanjima, većinom zbog činjenice da korištene metode određivanja nisu standardizirane i zbog hidrofobnosti samih peptida (32).



### 1.8.3 Drugi potencijalni biokemijski biljezi u likvoru i krvi

Različite molekule koje su direktno ili indirektno uključene u proces deponiranja amiloidnih plakova i nakupljanje neurofibrilarnih spletova, ispitivane su kao mogući biljezi rane faze AD. Utvrđeno je da je koncentracija sulfatida u likvoru ispitanika s MCI niža od koncentracije izmjerene kod zdravih ispitanika i povezana je s česticama koje sadrže ApoE u likvoru (34). Klinički važni plazmatski peptidi pokazuju veliku varijabilnost. Osim toga, velika zapreka široj primjeni je u troškovima vezanim uz validaciju takvih molekula na platformama za proteomiku (35). Neurotrofni moždani čimbenik (engl. brain-derived neurotrophic factor, BDNF) je protein koji ima neuroprotektivnu ulogu. Rezultati istraživanja na skupinama pacijenata s MCI i AD su pokazali da ti bolesnici imaju veću koncentraciju BDNF u serumu, u odnosu na zdrave ispitanike (36). Međutim, BDNF u serumu može potjecati i iz trombocita i aktiviranih imunskih stanica, pa su dobiveni rezultati različitih istraživanja vezanih uz BDNF kontradiktorni. U okviru kohortnog istraživanja pod nazivom Texas Alzheimer's Research Consortium (TARC) provedenom na 399 ispitanika (198 ispitanika s vjerojatnom AD i 201 kontrolni ispitanik) nisu nađene značajne razlike u koncentraciji BDNF-a između bolesnika i zdravih ispitanika (37). Istraživanje koje je provedeno na 400 ispitanika u sklopu projekta TARC bavilo se usporedbom koncentracija širokog spektra serumskih proteina, u kombinaciji s ostalim demografskim podacima, ApoE statusom između bolesnika s AD i zdravih ispitanika. Koncentracije su određivane pomoću „multiplex“ fluorescentnih imunotestova. Najveći broj proteina koji su bili pretjerano ili premalo eksprimirani su bili povezani s upalnim procesom, poput IL-5, IL-7, IL-10, CRP i TNF $\alpha$  (engl. tumor necrosis factor alpha). Time je potvrđeno postojanje upalnog endofenotipa unutar populacije oboljelih od AD (38). Transmembranski receptor CD40 djeluje na aktiviranje imunskih stanica i poticanje kostimulacijskih molekula i citokina. *Post-mortem* istraživanja na ispitanicima oboljelim od AD pokazala su da su CD40 i njegov ligand CD40L prisutni u senilnim plakovima. Aktiviranje mikroglije pomoću A $\beta$  42 i fosforilacija **tau** proteina su posredovane sa CD40. Skupina istraživača je utvrdila da su koncentracije plazmatskog, topljivog CD40 veće u osoba s dijagnozom MCI nego u zdravih ispitanika slične dobi (39). Istraživanja su pokazala da koncentracije čimbenika rasta u likvoru i plazmi bolesnika s AD mogu biti značajno različite od koncentracija izmjerenih kod zdravih ispitanika. Većina ispitivanih čimbenika rasta, poput hepatocitnog čimbenika rasta (engl. hepatocyte growth factor, HGF), VEGF (engl. vascular endothelial growth factor), GDNF (engl. glial cell line-derived neurotrophic factor), FGF-2 (engl. fibroblast growth factor-2) nije pokazala konzistentne rezultate. Jedini čimbenik rasta s istovjetnim dokazima o povećanim

koncentracijama u likvoru u kasnijim fazama AD je NGF (engl. nerve growth factor) (40). Ispitivanja koncentracije citokina, poput IL-1 $\alpha$  i 1- $\beta$ , **IL-6**, IL-10, IL-11, IL-18, TNF- $\alpha$  u likvoru, plazmi i serumu dala su različite rezultate, dok su istraživanja pokazala da bi kombiniranje nekoliko različitih plazmatskih kemokina npr. MIP1 $\delta$ , MIP4 (engl. macrophage inflammatory protein) moglo biti korisno u dijagnosticiranju AD i MCI (40). Povećane koncentracije pro-upalnih citokina ukazuju na njihov utjecaj u upalnom procesu i oštećenje funkcije neurona kod AD. Dijagnostička osjetljivost i specifičnost biljega iz krvi je niža od biljega u likvoru, zbog nemogućnosti njihovog prelaska kroz krvno-moždanu barijeru. Proteomskom analizom se uspjelo od 94 proteina koji su potencijalni kandidati za biljege u krvi, izdvojiti 9 koji su pokazali direktnu povezanost s AD. Velika zapreka pronalasku idealnog biljega je i nedovoljna standardizacija postupaka koji obuhvaćaju uzorkovanje, metode određivanja i uvjete pohrane uzoraka. Tehnike koje koriste masenu spektrometriju u kombinaciji s NMR-om omogućavaju razlikovanje bolesnika s AD od kognitivno zdravih osoba pomoću kombinacija citokina, kemokina, čimbenika rasta i transportnih proteina. Istraživanja sa sofisticiranom opremom usmjerena su prema panelima strukturnih molekula poput sfingolipida ili molekula uključenih u signalne puteve (41). Skupina znanstvenika uključenih u TARC određivala je u uzorcima seruma bolesnika s različitim stadijima AD (rani i vrlo rani) i zdravih kontrolnih ispitanika nekoliko biljega. Utvrdili su da kombiniranje 2 biljega: TNF- $\alpha$  i IL-7, demografskih podataka i neuropsihološkog testa omogućava ranu dijagnostiku AD (42). Longitudinalno kohortno istraživanje Whitehall II koje je provedeno na 5217 ispitanika u periodima od 1991-1993. i od 1997-1999. godine pokazalo je da je izraženije kognitivno propadanje bilo povezan s većim koncentracijama **IL-6** u serumu (43). Većina ispitivanja biljega u krvi kombinira dobivene rezultate s rezultatima biljega u likvoru, te s kognitivnim testovima i slikovnim tehnikama i pomoću matematičkih modela izračunava mogućnost postojanja amiloidnih plakova u mozgu. Apostolova i suradnici su u takav model uključili cijeli niz biljega u krvi poput ApoE, BDNF, TNF- $\alpha$ , IL-6R, IL-13 i **CLU** (44).

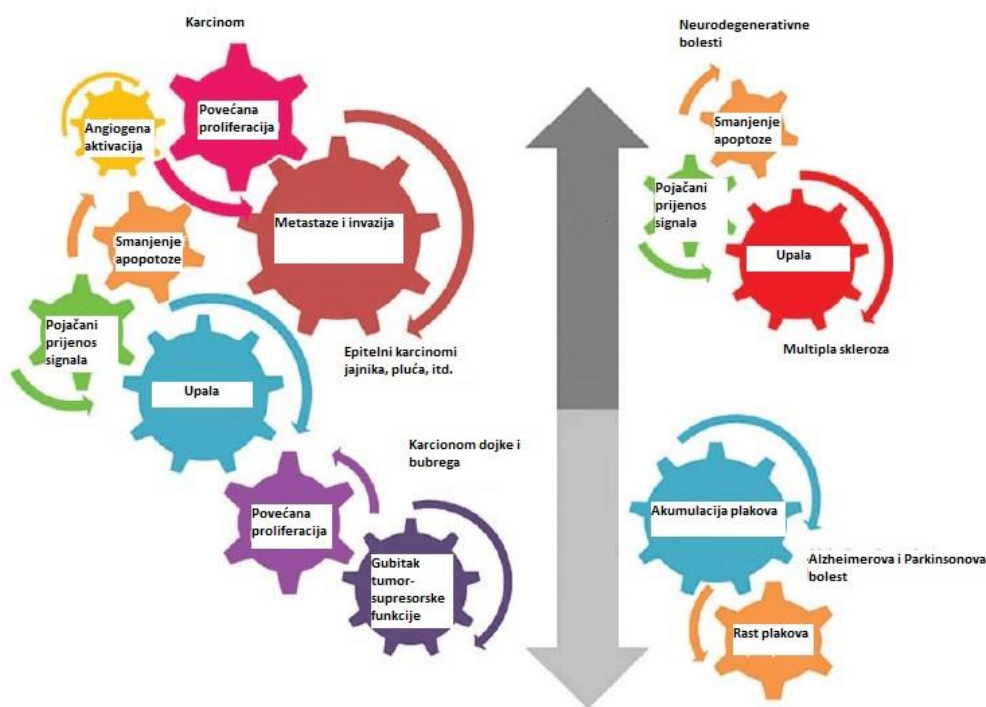
## 1.9 Novi biokemijski biljezi demencije

### 1.9.1 Neurozin (humani kalikrein 6)

**Neurozin** je stariji naziv za molekulu iz skupine serinskih proteaza, koja je u literaturi bila poznata pod raznim nazivima (proteaza M, serinska proteaza 9, SP59, i dr.), a koja se danas uobičajeno u literaturi naziva humani kalikrein 6 (**KLK6**). Molekula **KLK6** je kodirana genom

iz skupine 15 KLK gena smještenih na kromosomu 19q13.3-13.4 (45). U skupini KLK gena su KLK1, tkivni kalikrein gen i geni za KLK2-KLK15 koji kodiraju serinske proteaze s aktivnostima tripsina ili kimotripsina. KLK15, KLK3, KLK2 i KLK4 su specifični za prostatu. Ostali članovi KLK skupine su heterogeno eksprimirani u različitim tkivima poput srca, pluća, mozga, gušterače, dojke i štitnjače. Supstrati za KLK proteine su raznoliki: matriks-metaloproteinaze, fibronektini, kolageni, latentni TGF $\beta$  (engl. transforming growth factor) i proteini koji vežu čimbenike rasta slične inzulinu. Inhibitori KLK proteina su serpini i  $\alpha$ 2-makroglobulin. Gen za **KLK6** kodira prepro-enzim koji se sastoji od 244 aminokiseline. Uklanjanjem 16 aminokiselina nastaje proenzim u endoplazmatskom retikulumu, a nakon sekrecije u izvanstanični prostor, proteolitičkim cijepanjem nastaje aktivni enzim koji se sastoji od 223 aminokiseline. Aktiviranje enzima provodi se pomoću proteinaza iz iste skupine (KLK 5, 4, 11, 14), urokinaza plazminogen aktivatorom ili glikozaminoglikanima. Dokazano je proteolitičko djelovanje **KLK6** na supstrate poput kazeina, kolagena tipa I i IV, fibrinogena, ali i sintetske supstrate koji odgovaraju strukturi N-terminalnog kraja APP (45). U normalnim tkivima je **KLK6** u najvećoj mjeri eksprimiran u tkivu središnjeg živčanog sustava. Imunohistokemijskom analizom ekspresije **KLK6** u različitim vrstama stanica i područjima mozga utvrđena je izražena ekspresija u epitelu koroidnog plesusa i umjerena u Purkinjeovim i glija stanicama. Uloga **KLK6** je ispitivana u eksperimentalnim modelima i na skupinama bolesnika kod demencije, Parkinsonove bolesti i multiple skleroze. Ispitivanja na staničnim linijama koje mogu sintetizirati  $\alpha$ -sinuklein, pokazala su da nesposobnost **KLK6** da razgradi taj protein, dovodi do njegovog nakupljanja, što je glavna značajka Parkinsonove bolesti. Poremećaj u upalnom odgovoru kod multiple skleroze povezuje se s povećanom koncentracijom **KLK6** u serumu oboljelih od te bolesti. Pretpostavlja se da je kod upalnog odgovora ključna sposobnost **KLK6** da aktivira receptore aktivirane proteazama. Proteolitička aktivnost **KLK6** u vanstaničnom matriksu održava ravnotežu u moždanom tkivu. **KLK6** ima sposobnost cijepanja APP na dva mjesta unutar A $\beta$  sekvence i na jednom izvan amino terminalnog dijela A $\beta$  sekvence. *Post-mortem* analizom moždanog tkiva zdravih ispitanika i oboljelih od AD nađena je smanjena ekspresija **KLK6** u moždanom tkivu pacijenata s AD u odnosu na skupinu zdravih ispitanika, dok je kod bolesnika s VAD *post-mortem* analizom nađena povećana ekspresija **KLK6** u vaskularnom endotelu čeonog korteksa. U eksperimentalnim animalnim modelima ispitivana je uloga **KLK6** nakon ozljede leđne moždine. Ozljeda je potaknula ekspresiju mRNA za **KLK6** u bijeloj tvari na mjestu ozljede i u okolnoj bijeloj i sivoj tvari (45). Određivanjem koncentracije **KLK6** u likvoru AD pacijenata nađene

su znatno manje koncentracije od ispitanika s perifernom neuropatijom. Osim u likvoru, **KLK6** eksprimiran je i u glija stanicama sive tvari zdravih ispitanika, dok je kod oboljelih od AD nađena povećana ekspresija u senilnim plakovima i neurofibrilarnim spletovima. *In vitro* ispitivanja djelovanja rekombinantnog **KLK6** dokazala su da razgrađuje mijelinski bazični protein i proteine vanstaničnog matriksa (46). Koncentracija **KLK6** u plazmi je određivana kod skupine bolesnika s MCI i kontrolne skupine na početku istraživanja i nakon 18 mjeseci. U skupini od 66 ispitanika s MCI, kod 30 bolesnika nije došlo do progresije u demenciju, dok se kod 23 bolesnika razvila AD i kod 13 VAD. Utvrđeno je da povećanje koncentracije **KLK6** ukazuje na konverziju MCI u VAD, koje autori tumače s ulogom **KLK6** u aktiviranju PAR-2. Receptori PAR-2 sudjeluju u moduliranju funkcije stanica endotela i vaskularnih glatkih mišića i utječu na razvoj VAD (47). U drugom istraživanju uspoređivana je koncentracija **KLK6** u plazmi kod zdravih osoba i kod osoba s kognitivnim simptomima, bez obzira na konačnu dijagnozu. Konačne dijagnoze bolesnika čiji su uzorci plazme korišteni u istraživanju obuhvaćale su AD, MCI, VAD, demenciju s Lewy-evim tjelešcima, frontotemporalnu demenciju, Huntingtonovu bolest, pseudodemenciju, itd. Rezultati su pokazali da su koncentracije **KLK6** bile veće u populaciji bolesnika s VAD i pseudodemencijom od koncentracija **KLK6** u skupini bolesnika s AD. Između dobi i koncentracije **KLK6** ponadena je pozitivna korelacija. U skupini bolesnika s dijagnozom AD našli su 43,2% nositelja ApoE4 alela, ali nisu utvrdili značajnu razliku u koncentraciji **KLK6** između nositelja i onih koji nisu nositelji ApoE4 (48). Martinez-Morillo i suradnici su utvrdili referentne intervale za **KLK6** u serumu (1,04 – 3,93 ng/mL) i izračunali indeks individualnosti za **KLK6**, koji iznosi 0,43, zbog čega se određivanje **KLK6** smatra klinički korisnim za praćenje stanja bolesnika, ali ne i postavljanje dijagnoze (49). Klinički značajna promjena koncentracije (engl. RCV, reference change value) iznosi 35% (49). Utvrđeno je da nema razlika u koncentraciji **KLK6** obzirom na spol ispitanika, ali postoji pozitivna korelacija s dobi ispitanika. Osim ispitivanja serumske koncentracije **KLK6** u populaciji zdravih ispitanika, autori su odredili koncentracije i kod oboljelih od bubrežnog zatajenja. Raspon koncentracija **KLK6** u toj skupini se kretao od 2,46 do 22,8 ng/mL, a koncentracije kreatinina od 68 do 1263  $\mu$ mol/L. Poremećaji u ekspresiji gena za **KLK6** povezani su s progresijom karcinoma i neurodegenerativnim bolestima (Slika 3) (45).



Slika 3. Prikaz posljedica poremećaja u regulaciji ekspresije **KLK6** – tamnosiva strelica prikazuje pojačanu, a svijetlosiva smanjenu ekspresiju **KLK6** (Prema: Bayani J, Diamandis EP. The physiology and pathology of human kallikrein related-peptidase 6 (**KLK6**). Clin Chem Lab Med 2012;50:211-33).

Gubitak ekspresije **KLK6** dovodi do promjene u stvaranju i eliminaciji proteina, čija je posljedica stvaranje plakova. Istraživanja koja su provedena razlikovala su se u oblikovanju i definiranju skupina ispitanika. **KLK6** je predmet mnogih istraživanja zbog njegove uloge u karcinogenezi i razvoju neurodegenerativnih oboljenja.

Dosadašnja istraživanja vezana uz neurodegenerativne bolesti provedena su u likvoru i serumu, odnosno plazmi i ishodi istraživanja su bili različiti. Razlog tome leži u prvom redu u razlikama u ustroju istraživanja, odnosno u kriterijima za odabir ispitanika, načinu na koji je formirana kontrolna skupina, odabiru matriksa i metoda pomoću kojih je određena koncentracija **KLK6**. Za utvrđivanje korisnosti primjene **KLK6** u kliničkoj praksi neophodno je definiranje ispitanika prema jasnim kriterijima.

Kontrolna skupina bi trebala biti sastavljena od osoba iste starosne dobi, a svi ispitanici bi trebali biti podvrgnuti sveobuhvatnoj neurološkoj obradi, čime bi se pružila mogućnost procjene određivanja serumske koncentracije **KLK6**, u odnosu na postojeće preporučene neuropsihološke testove i slikovne tehnike. Određivanje serumske koncentracije **KLK6** u

uvjetima standardnih kliničkih postupaka omogućilo bi objektivnu procjenu te molekule kao potencijalnog neinvazivnog biljega za diferencijalnu dijagnostiku demencija.

### 1.9.2 Klasterin

Klasterin (**CLU**, engl. clusterin) je multifunkcionalni protein kojeg kodira gen smješten na kromosomu 8p21-p12. Primarni polipeptid sadrži 449 aminokiselina. Odstranjivanjem N-terminalnog signalnog peptida od 22 aminokiseline i cijepanjem nastaju 2 peptida  $\alpha$  i  $\beta$  koji su povezani disulfidnim mostovima.

**CLU** je visoko konzerviran među vrstama zbog svoje uloge u apoptozi, proliferaciji i agregiranju proteina. Eksprimiran je u žlijezdama, placenti, jetri, bubrezima i većini tjelesnih tekućina. On pripada skupini proteina pratitelja (engl. chaperone) i može vezati molekule uključene u patološke procese karakteristične za AD (50).

Proteini pratitelji predstavljaju funkcionalno povezanu skupinu proteina koji potpomažu nabiranje proteina u stanici. Oni sprječavaju agregiranje proteina prije završetka nabiranja. Njihovim djelovanjem onemogućava se nastajanje nefunkcionalnih međuprodukata. Nakon što proteini prijeđu staničnu membranu, njihovo ponovno nabiranje se provodi pomoću proteina pratitelja.

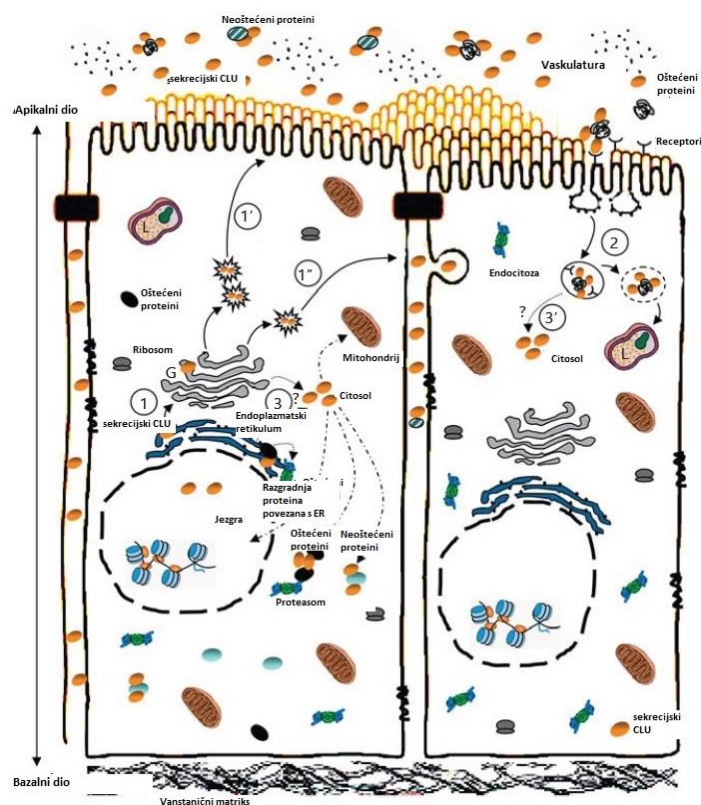
Proteini pratitelji sudjeluju i u transportu proteina u stanične organele, mitohondrije i endoplazmatski retikulum (51). Svojim djelovanjem sprječavaju nakupljanje modificiranih proteina i usmjeravaju oštećene proteine na razgradnju u lizosome. Kao protein pratitelj, **CLU** stabilizira proteine izložene stresu i dovodi ih u stanje koje je pogodno za djelovanje molekula poput proteina toplinskog stresa.

Ekspresija gena za **CLU** je povećana kod tumorskih oboljenja, ateroskleroze i neurodegenerativnih bolesti. Njegova ekspresija u fiziološkim okolnostima najmanje je izražena u mikroglia stanicama, a najviše u neuronima hipokampusa i Purkinjeovim stanicama. Pretpostavlja se da povećana ekspresija **CLU** kod AD predstavlja odgovor na formiranje amiloidnih plakova.

Eksperimentalnim modelima je dokazano da **CLU** povećava topljivost **A $\beta$**  i sprječava agregiranje i formiranje neuritičkih plakova. **CLU** je uključen u imunosni odgovor astrocita, jer IL-1 $\beta$  i IL-2 povećavaju njegovu ekspresiju, dok **IL-6** i interferon- $\gamma$  nemaju utjecaja na njegovu ekspresiju. Dokazan je značajan porast ekspresije **CLU** u astrocitima kod glioma,

epilepsije, ishemije i ozljeda leđne moždine. Uspoređen je napredak u oporavku nakon ishemijskog inzulta između skupine miševa bez gena za sintezu **CLU** i divljeg tipa. Skupina bez **CLU** se znatno sporije i teže oporavljala u odnosu na divlji tip.

Uloga **CLU** u procesu nakupljanja proteina bi mogla biti dvojaka, jer njegovim vezanjem dolazi do promjene površinskog naboja fibrila i njihovog prikrivanja, čime se oni štite od imunskog odgovora. U pokusima na transgeničnim miševima s AD nađeno je da je **CLU** inhibirao komplement, što je dovelo do stimuliranja nakupljanja amiloida i napredovanja neurodegeneracije (50). U plazmi je **CLU** prisutan u nekoliko subklasa HDL-čestica vezan za apolipoprotein A-1 i obično se u literaturi imenovao kao apolipoprotein J. Najveći sekretori lipoproteinskih čestica koje sadrže **CLU** su astrociti jetre i mozga. Ligandi koji vežu sekrecijski klasterin (**sCLU**) su osim lipoproteina i čimbenici komplementa, imunoglobulini, prionski proteini i dr. Osim **sCLU**, u stanicama karcinoma i staničnim linijama izloženim stresu nađen je i klasterin jezgre (**nCLU**, engl. nuclear clusterin). Pretpostavlja se da je **nCLU** povezan s apoptozom induciranom staničnom smrću (Slika 4) (52).



Slika 4. Primjer djelovanja sekrecijskog **CLU** u sekrecijskoj epitelnjoj stanici. (Prema: Trougakos IP. The molecular chaperone apolipoprotein J/clusterin as a sensor of oxidative stress: implications in therapeutic approaches – a mini-review. *Gerontology* 2013;59:514-23.)

Kao što se vidi na slici, sinteza sekrecijskog **CLU** odvija se u endoplazmatskom retikulumu (1). Sintetizirani protein dodatno se obrađuje u Golgijevom tjelešcu (G) i secernira u apikalne (1') i bazolateralne (1'') vanstanične prostore. U vanstaničnom prostoru **CLU** prati neoštećene proteine ili se veže za oštećene, nefunkcionalne proteine. Oštećene proteine usmjerava na lizosome (L) pomoću endocitoze posredovane receptorima radi razgradnje (2). Sekrecijski **CLU** može usmjeriti oštećene proteine na razgradnju proteina povezanu s endoplazmatskim retikulumom (ER) pomoću proteasoma. Nepoznati mehanizam, označen s 3 i 3', lokalizira sekrecijski **CLU** u citosolu, odakle se može premjestiti u jezgru ili mitohondrij. Sekrecijski **CLU** iz citosola može vezati fiziološki normalne proteinske komplekse ili usmjeriti proteine na razgradnju u proteasome.

Traumatska ozljeda mozga i moždani udar uzrokuju izraženu imunoreaktivnost **CLU** u neuronima i astrocitima u zoni ozljede, odnosno penumbri. Uloga **CLU** u patogenezi AD je intenzivno ispitivana posljednjih godina. GWAS istraživanja su utvrdila postojanje jednonukleotidnog polimorfizma (engl. single nucleotide polymorphism, SNP) koje je povezano s smanjenim rizikom za razvoj AD. Pretpostavlja se da homozigotna ekspresija C-alela nosi povećani rizik za AD. Kod pacijenata oboljelih od AD nađeno je sustavno povećanje koncentracije **CLU** u likvoru. Istraživanja na vanstaničnom s**CLU** su pokazala da on onemogućava agregiranje monomera A $\beta$ 1-40 i da eliminira oligomere i na taj način sprječava njihov štetan utjecaj (52).

Najnovija istraživanja ukazuju na ulogu **CLU** kao biosenzora oksidativne ozljede. Jedna od teorija starenja zasnovana je na nakupljanju slobodnih radikala i njihovom negativnom učinku na stanice. Oksidativni stres vodi ka oštećenju proteina i prekidu normalnih proteolitičkih puteva. Kod oksidativne ozljede u organizmu se aktiviraju antioksidacijski sustavi, te transkripcijski čimbenici, a proteini pratitelji vežu oštećene proteine i omogućavaju njihovu razgradnju. Receptori za gp330/megalin u koroidnom pleksusu posreduju u prijenosu **CLU** vezanog u komplekse kroz krvno-moždanu barijeru. Pretpostavlja se da **CLU** aktivno sudjeluje u eliminiranju A $\beta$  transportom iz moždanog tkiva u plazmu.

Proteini pratitelji igraju važnu ulogu u očuvanju integriteta i funkcionalnosti strukturnih proteina. **CLU** je, kao posrednik u prepoznavanju i uklanjanju oštećenih proteina, uključen u niz patoloških procesa. Smatra se da je uloga **CLU** u neurodegenerativnim procesima uglavnom neuroprotektivna, jer ograničava pogrešno nabiranje A $\beta$  i ubrzava njegovu eliminaciju iz vanstaničnog prostora. Plazmatski sadržaj **CLU** je povezan s atrofijom entorinalnog korteksa i



progresijom AD (53). Skupina znanstvenika je pomoću matematičkih modela ispitala odnos likvorske koncentracije **CLU**, **Aβ**<sub>1-42</sub> i **p-tau** proteina na brzinu atrofije entorinalnog korteksa i hipokampusa. Rezultati su pokazali da je kod kognitivno zdravih starijih osoba gubitak volumena entorinalnog korteksa povezan s **Aβ** praćen istovremenim povećanjem **CLU**, što ukazuje na istaknutu ulogu **CLU** u ranoj fazi AD. Pretpostavlja se da utjecaj **CLU** na **Aβ** prethodi učinku **tau**-proteina na proces neurodegeneracije.

Neuroprotektivno i neurotoksično djelovanje **CLU** u razvoju AD povezano je s promjenama u udjelu vanstaničnog i unutarstaničnog **CLU** (54). Dvostruki učinak **CLU** u AD nađen je na *in vivo* modelima kod kojih se anti-AD djelovanje očituje u olakšavanju eliminacije **Aβ**, a pro-AD djelovanje u poticanju stvaranja toksičnih oligomera i posredovanju u Dkk-Wnt-JNK citotoksičnom putu potaknutom s **Aβ**. Karakter učinka **CLU** bi mogao ovisiti o omjeru **CLU** u odnosu na koncentraciju **Aβ**. Ako je omjer **CLU/Aβ** povećan, do izražaja dolazi zaštitna uloga **CLU**. Suprotno tome, kod smanjene vrijednosti omjera **CLU/Aβ**, učinak **CLU** je citotoksičan.

Protuupalna i zaštitna uloga **CLU** ispitivana je u eksperimentalnim animalnim modelima. Ustanovljeno je da davanje **CLU** kod miševa s AD ima protuupalni i anti-apoptotički učinak. Korištenje **CLU** kao mogućeg terapijskog sredstva kod AD bi trebalo biti usmjereno na poticanje njegovog pozitivnog učinka u vidu sprječavanja nastajanja plakova i uklanjanja **Aβ**. Istovremeno bi se trebali potisnuti njegovi negativni učinci koji se manifestiraju stvaranjem oligomera **Aβ** i unutarstaničnim, toksičnim djelovanjem (55). U pilot-istraživanju provedenom kod bolesnika s dijagnozom AD i kognitivno zdravih ispitanika utvrđeno je da nema razlike u koncentraciji **CLU** u plazmi i trombocitima između ispitivanih skupina. Autori pretpostavljaju da su različiti rezultati istraživanja **CLU** povezani s komorbiditetima, uzimanjem lijekova i spolom ispitanika u skupini oboljelih od AD (56). Dosadašnja istraživanja provedena na **CLU** kao potencijalnom krvnom biljegu demencije pokazala su kontradiktorne rezultate (53,56). Većina istraživanja bila je fokusirana na usporedbu rezultata određivanja serumskog ili plazmatskog **CLU** s nalazima slikovnih tehnika koje se koriste u dijagnostici AD. Ono što nedostaje je sveobuhvatna usporedba važećih testova koji se koriste u dijagnosticiranju i praćenju demencija s određivanjem koncentracije **CLU** u serumu i procjena diskriminacijske moći te molekule u diferencijalnoj dijagnostici demencija.

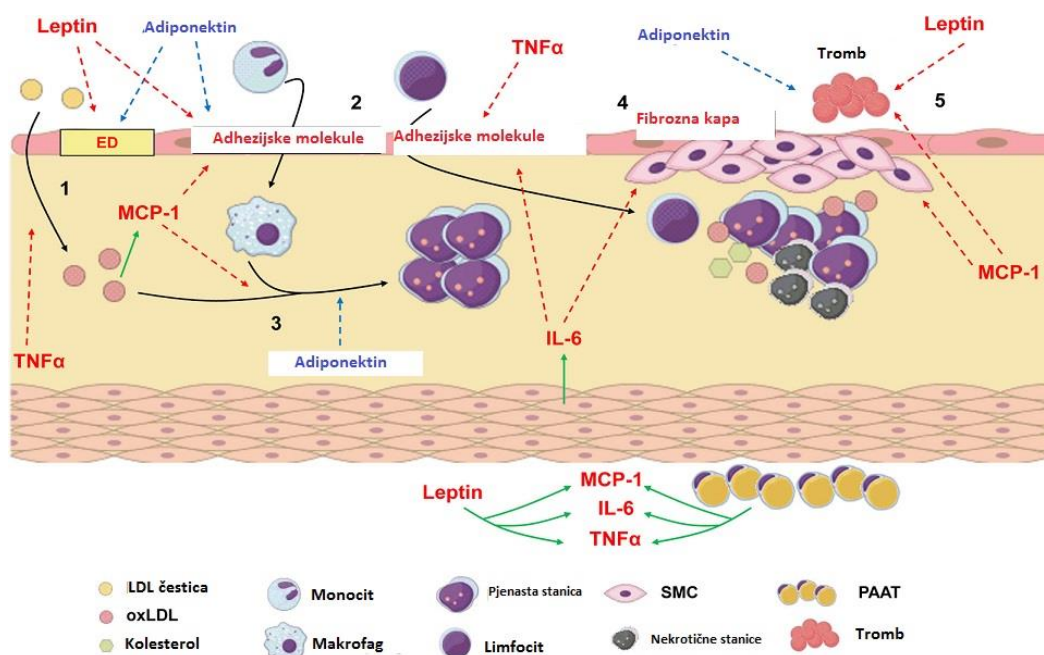
### 1.9.3 Adiponektin

Adiponektin (**ADPN**) je adipocitokin koji se u cirkulaciji nalazi u obliku trimera, heksamera ili u visokomolekularnom obliku. Sintezu **ADPN** kodira gen **APM1** smješten na kromosomu 3q27. Postoje dvije vrste receptora za **ADPN**: AdipoR1 (najviše zastupljen u skeletnom mišiću) i AdipoR2 (najzastupljeniji u jetri). U eksperimentalnim animalnim modelima nedostatak AdipoR1 dovodi do gubitka aktivacije AMP-aktivirane protein kinaze (AMPK), a kod nedostatka AdipoR2 poremećaj se reflektira na prijenos signala putem receptora  $\alpha$  aktiviranog s peroksisom proliferatorom. AdipoR1 potiču unos glukoze u mišićne stanice translokacijom GLUT4 na površinu stanice koja je posredovana aktiviranom AMPK. Kod glodavaca kojima nedostaje gen za sintezu **ADPN** nađena je inzulinska rezistencija i smanjena količina proteina-supstrata za inzulinski receptor.

Djelovanje **ADPN** je protuupalno i očituje se smanjenjem sekrecije **IL-6** u stanicama moždanog endotela. **ADPN** utječe na osjetljivost na inzulin u mozgu, a inzulin djeluje putem regulacije ionskih kanala i receptora za neurotransmitore na kognitivnu sposobnost i pamćenje. Paralelno s progresijom AD smanjuje se ekspresija inzulina i inzulinu sličnog čimbenika rasta (engl. insulin like growth factor-1, IGF-1) (57).

Smanjena koncentracija **ADPN** povezana je s povećanim rizikom za razvoj kardiovaskularnih oboljenja i šećerne bolesti. Čimbenici rizika za razvoj VAD uključuju hipertenziju, šećernu bolest i aterosklerozu. Inzulin i inzulinski receptori su rasprostranjeni u mozgu. Aktiviranje signalnih puteva posredovano s inzulinom i IGF-1 u neuronima dovodi do sinteze proteina uključenih u metabolizam glukoze i antiapoptotske procese. Upravo u području koroidnog pleksusa i korteksa hipokampusa utvrđeno je smanjenje broja inzulinskih receptora kod starijih osoba.

**ADPN** ima i vazodilacijski učinak jer potiče stvaranje dušikovog oksida (NO) aktiviranjem signalnog puta AMPK. Kod aterosklerotskog procesa **ADPN** djeluje antiaterogeno inhibicijom aterogenih molekula poput ICAM-1 (engl. intracellular adhesion molecule), VCAM-1 (engl. vascular cell adhesion molecule) i selektina. Osim toga, on sprječava pretvaranje makrofaga u pjenaste stanice (Slika 5).



Slika 5. Prikaz procesa aterogeneze koji je posredovan različitim adipocitokinima. (Prema: Freitas Lima LC, et al. Adipokines, diabetes and atherosclerosis: an inflammatory association. Front in Physiol 2015; 6:304)

Kako je prikazano na slici: 1. Leptin i TNFα potiču disfunkciju endotela, dok **ADPN** ima suprotan učinak 2. LDL se oksidira (oxLDL) u subendotelnom prostoru. MCP-1 (engl. monocyte chemoattractant protein), leptin, **IL-6**, i TNFα povećavaju ekspresiju adhezijskih molekula i transigraciju leukocita u endotelu. 3. Pod utjecajem MCP-1 monociti se transformiraju u makrofage i fagocitiraju oxLDL, pretvarajući se u pjenaste stanice. Taj proces inhibira **ADPN** 4. Stanice glatkog mišićja (SMC, engl. smooth muscle cells) pod djelovanjem angiotenzina II stvaraju **IL-6** koji zajedno s MCP-1 povećava proliferaciju SMC i deponiranje vanstaničnog matriksa, pri čemu nastaje fibrozna kapa oko nekrotične srži koja je bogata lipidima. 5. MCP-1 i leptin potiču kidanje plaka i formiranje tromba, dok **ADPN** inhibira trombozu. Periadventicijsko adipozno tkivo (PAAT) i leptin potiču nastajanje proupalnih adipokina. Crvene strelice predstavljaju proupalne puteve koji su stimulirani kod pretilosti i sudjeluju u aterogenezi. Plave strelice predstavljaju protuupalne puteve koji su inhibirani kod pretilosti jer su koncentracije **ADPN** niske. Zelene strelice predstavljaju nastajanje ili stimulaciju sekrecije adipokina.

Niske koncentracije **ADPN** povezane su s povećanim rizikom za moždani udar. Nađeno je nekoliko SNP na genu za **ADPN** koji jasno povezuju **ADPN** s inzulinskom rezistencijom, metaboličkim sindromom, šećernom bolesti tipa 2 i koronarnom srčanom bolesti. U

istraživanjima signalnih puteva ključnih za održavanje procesa zdravog starenja koje je praćeno sa minimalnim oštećenjem signalnih molekula i čimbenika transkripcije nađeno je da je upravo osjetljivost na inzulin najvažnija. Moždani inzulinski receptori i receptori za IGF-1 utječu na sinaptičku plastičnost i na funkciju pamćenja. **ADPN** i njegovi receptori održavaju funkcionalnost inzulinskih signalnih puteva i tako indirektno utječu na kognitivni status. Endotelna sintaza NO se aktivira djelovanjem **ADPN** i na taj način ostvaruje učinak vazodilatacije i inhibicije aterogeneze. Kod reperfuzije u moždanoj ishemiji, **ADPN** sprječava međudjelovanje leukocita i endotelnih stanica i smanjuje stupanj oštećenja. **ADPN** aktivira vaskularni endotelni čimbenik rasta i potiče angiogenezu te smanjuje volumen infarkta (58). Skupina autora pratila je serumsku koncentraciju **ADPN** u populaciji ispitanika s MCI i AD. Početne koncentracije u skupini MCI i AD su bile značajno niže od koncentracija u skupini zdravih ispitanika. Kod drugog određivanja koncentracije **ADPN** nije došlo do značajnih razlika bez obzira na činjenicu da je kod nekih ispitanika s MCI došlo do progresije u AD i isto tako, neki kognitivno zdravi ispitanici su postali MCI bolesnici. Niske inicijalne koncentracije **ADPN** u populaciji bolesnika s AD i MCI autori smatraju poveznicom između rizika za razvoj AD i kliničkih poremećaja poput šećerne bolesti tipa 2, ateroskleroze i metaboličkog sindroma (59). Potrebno je više presječnih i longitudinalnih istraživanja pomoću kojih bi se utvrdila klinička korisnost **ADPN** u dijagnostici i praćenju demencija. **ADPN** je, kao adipocitokin uključen u niz procesa koji sprječavaju razvoj inzulinske rezistencije i ateroskleroze. Disfunkcija adipoznog tkiva koja za posljedicu ima poremećaj u stvaranju ovog citokina vodi ka nastanku čimbenika rizika povezanih s cerebrovaskularnim oboljenjima. Zbog toga bi **ADPN** mogao biti koristan biljeg u razlikovanju oboljelih od VAD i neurodegenerativne demencije.

#### **1.9.4 Interleukin-6**

Interleukin-6 (**IL-6**) pripada skupini citokina, glikoproteina koji posreduju u komunikaciji među raznim vrstama stanica. Djelovanje **IL-6** je proupalno i očituje se već u prvim satima od početka upalnog odgovora s poticanjem jetrene sinteze proteina akutne faze, u prvom redu CRP-a. Zbog značajne uloge u upalnom procesu, **IL-6** je predmet interesa u mnogim istraživanjima, od sepse, šećerne bolesti, kardiovaskularnih oboljenja do neurodegenerativnih poremećaja. Aktiviranje mikroglija dovodi do promjena u ekspresiji citokina, na čiju sintezu dodatno utječu čimbenici rizika za neurodegenerativna oboljenja, poput starenja i stresa. Istraživanja na kulturi stanica sastavljenoj od astrocita i glija stanica pokazala su da **AB** potiče

sintezu **IL-6**. Manji volumen hipokampusa utvrđen je slikovnom tehnikom kod starijih osoba bez dijagnoze demencije kojima je istovremeno povećana koncentracija **IL-6**. Nakupljanje **Aβ42** potiče upalni odgovor budući da izlaganje mikroglije nakupinama **Aβ** povećava sintezu **IL-6** i M-CSF. U istraživanju provedenom na bolesnicima s dijagnozom AD i zdravim ispitanicima iste dobi, određivane su plazmatske koncentracije upalnih citokina **IL-6**, **IL-18**, kemokina fraktalkina (**CX3CL1**) i **TRAIL-a** (engl. tumor-necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand). Većina ispitanika s dijagnozom AD imala je blagi oblik bolesti. Koncentracije **IL-6** su bile veće u skupini oboljelih od AD (60). Skupina znanstvenika je pomoću mikropostroja za proteine i kvantitativnih multiplex testova određivala koncentracije signalnih proteina i citokina u serumu i likvoru bolesnika s AD i zdravih ispitanika. U sklopu istraživanja, određivana je koncentracija s**IL-6R** (engl. soluble interleukin-6 receptor) i nađena je značajna razlika u koncentraciji s**IL-6R** u uzorcima likvora između ispitivanih skupina, ali ne i u uzorcima seruma (61). Polimorfizam gena za **IL-6** –174 G>C koji uzrokuje veću ekspresiju je ispitivan u skupinama osoba starijih od 75 godina sa određenim stupnjem kognitivnog deficita i nađeno je da je frekvencija tog polimorfizma veća u skupini osoba s izraženijim kognitivnim propadanjem. Osobe s genskom predispozicijom za intenzivniju sintezu **IL-6** pokazuju brže kognitivno propadanje (62). U preglednom članku analizirani su podaci objavljeni u 118 članaka o citokinima i njihovim receptorima uključenim u upalni odgovor u AD i MCI. U analiziranim radovima koncentracije citokina i receptora su određivane u serumu, plazmi i likvoru. Istraživanja su utvrdila povezanost koncentracije citokina sa količinom amiloida i ApoE genotipom, a u nekim istraživanjima koncentracije citokina su podijeljene na kategorije obzirom na fazu bolesti. Najčešće ispitivani citokini su **TNF-α** i **IL-6**. Autori su obradili podatke iz onih članaka o **IL-6** u kojima je broj ispitanika bio veći od 20. Većina istraživanja provedenih na **IL-6** pokazala je da su koncentracije povišene ili na istoj razini u uzorcima krvi i likvora oboljelih od AD, dok je manji broj istraživanja utvrdio smanjenu koncentraciju tog citokina. Autori pretpostavljaju da je uzrok heterogenosti rezultata istraživanja velika interindividualna varijabilnost **IL-6**. Rezultati istraživanja koja su ispitivala povezanost koncentracije **IL-6** s težinom AD pokazali su da su koncentracije **IL-6** povećane u populaciji bolesnika s teškom AD. Istraživanja citokina su se razlikovala u definiranju vrste bolesti i kriterija po kojima su definirane skupine bolesnika, vrste uzoraka i metode određivanja koncentracije citokina. U većini publikacija korištena je ELISA metoda za određivanje koncentracije, ali zbog razlika u vrsti korištenih antitijela u pojedinim reagensima rezultati su heterogeni. Uvjeti pohrane i samog rukovanja uzorcima za određivanje citokina također značajno utječu na rezultate. Autori

su **IL-6**, uz  $\text{TNF-}\alpha$  i  $\text{IL-1}\beta$  svrstali u skupinu citokina čija bi visoka koncentracija kod asimptomatskih osoba mogla predstavljati povećani rizik za razvoj AD (63). Uloga **IL-6** u dijagnostici demencija bi se trebala ispitati na precizno definiranim skupinama ispitanika koje sadrže odgovarajući broj ispitanika koristeći metode koje su validirane i standardizirane.

## 2 HIPOTEZE I CILJEVI

Praćenje bolesnika s dijagnozom AD i VAD obuhvaća procjenu kognitivnog deficita pomoću neuropsiholoških testova, primjenu slikovnih tehnika i neurosonoloških testova. Rutinsko laboratorijsko praćenje stanja dementnih bolesnika sastoji se u određivanju koncentracije metaboličkih i upalnih pokazatelja.

Pretpostavka je da će se ispitivane skupine oboljelih od AD i VAD razlikovati od kontrolne skupine pri analizi čimbenika rizika kao što je indeks tjelesne mase, pušenje, hipertenzija, dijagnoza šećerne bolesti i kardiovaskularne bolesti.

Značajna razlika se očekuje između ispitivanih skupina u rezultatima neurosonoloških i slikovnih testova, kao i procjeni kognitivnih sposobnosti pomoću neuropsiholoških testova. Očekuje se da će parametri povezani s aterosklerotskim promjenama na stjenkama krvnih žila poput zadebljanja intime i medije karotidne arterije imati najveća odstupanja od normalnih vrijednosti u skupini pacijenata pogođenih s VAD.

Alzheimerova bolest i VAD su oboljenja koja imaju kompleksnu patofiziološku podlogu. U žarištu interesa ovog istraživanja nalaze se molekule: **KLK6**, **CLU**, **ADPN** i **IL-6**. Svaka od navedenih molekula je obzirom na specifičnu ulogu uključena u nastanak demencija. **KLK6** djeluje proteolitički na APP. Proces nastanka amiloidnih plakova povezan je sa stupnjem aktivnosti **KLK6**. **CLU** je kao protein pratitelj uključen u proces agregiranja **A $\beta$**  proteina. **ADPN** je adipocitokin čije je djelovanje usmjereno protiv ključnih procesa koji vode ka nastanku ateroskleroze, inzulinske rezistencije i hipertenzije. Upalni odgovor ozlijeđenog tkiva neizostavno je praćen povećanom sintezom proupalnog citokina, **IL-6**.

**Hipoteza** ovog istraživanja je da će se koncentracija **KLK6**, **CLU**, **ADPN** i **IL-6** u serumu bolesnika s dijagnozom AD razlikovati od koncentracije u serumu bolesnika s VAD. Njihova diskriminacijska uloga bi trebala biti iskazana i kod definiranja populacije kognitivno zdravih ispitanika iste dobi u odnosu na oboljele od demencije. Isto tako, koncentracija biljega u krvi jasno bi odvojila i populaciju oboljelih od blagog kognitivnog poremećaja.

Pretpostavka je da će koncentracije ispitivanih biljega korelirati s rutinskim laboratorijskim metaboličkim pokazateljima pozitivno, odnosno negativno ovisno o tome o kojem se pokazatelju radi. Isto tako, očekuje se statistički značajna korelacija između ispitivanih

biokemijskih biljega i rezultata neuropsiholoških, slikovnih i neurosonoloških testova koji se koriste u sklopu standardne obrade oboljelih od demencije.

**Cilj** ovog rada je ispitati da li koncentracije potencijalnih biljega demencije **KLK6**, **CLU**, **ADPN** i upalnog biljega **IL-6**:

- imaju diferencijalno dijagnostičko značenje u razlikovanju AD i VAD.
- pokazuju diskriminacijski potencijal kada je u pitanju razlikovanje skupine oboljelih od demencije i skupine kognitivno zdravih ispitanika iste dobi. Obzirom da pojedinci u starijoj populaciji pokazuju znakove blagog kognitivnog propadanja, populacija zdravih ispitanika dijeli se na one koji su kognitivno zdravi i one s dijagnozom blagog kognitivnog poremećaja.
- koreliraju s težinom kognitivnog deficita procijenjenom pomoću neuropsiholoških testova i s rezultatima slikovnih tehnika i neurosonoloških testova.



## 3 ISPITANICI I METODE

### 3.1 Ispitanici

Uzorci seruma su prikupljeni od bolesnika s dijagnozom AD (N = 70) i VAD (N = 67) koji su primljeni na Klinici za neurologiju KBC Sestre milosrdnice radi redovnog neurološkog praćenja bolesti u periodu od studenog 2010. do travnja 2014. godine. Kriterij uključenja za skupine ispitanika s dijagnozom VAD i AD su dijagnoza VAD, odnosno AD. Alzheimerova bolest je dijagnosticirana prema kriterijima NINCDS - ADRD (10). VAD je dijagnosticiran prema NINDS - AIREN preporukama (12). Kod svih skupina uključenih u istraživanje kriterij uključenja je bila starost iznad 60 godina. Kontrolni ispitanici su bili supružnici bolesnika s dijagnozom AD i VAD koji su bili uključeni u istraživanje i kognitivno zdravi bolesnici koji su bili upućeni na Kliniku za neurologiju radi nekih drugih neuroloških poremećaja (N = 98). Kriteriji isključenja su demencije drugog porijekla (tumorska, hidrocefalus, demencija uzrokovana nedostatkom neke tvari ili trovanjem), maligne bolesti, te bubrežna ili jetrena disfunkcija. Budući da su u skupini kontrolnih ispitanika iste dobi (stariji od 60 godina) neki ispitanici pokazivali znakove blagog kognitivnog poremećaja, definirane su dvije kontrolne skupine: a) kontrolni ispitanici sa MCI i b) kognitivno zdravi ispitanici. MCI je bio dijagnosticiran prema Petersenovim kriterijima (64).

Za svakog ispitanika prikupljeni su demografski podaci (dob, spol, indeks tjelesne mase (engl. body mass index, BMI), broj godina obrazovanja) i podaci o vaskularnim čimbenicima rizika (hipertenzija, šećerna bolest, srčane bolesti, fibrilacija atrijska, pušenje). Pušači, odnosno nepušači su kategorizirani na sljedeći način po skupinama: 0 – nepušači; skupina 1 - bivši pušači (prestali su pušiti unatrag 5 godina od kada su uključeni u istraživanje) i skupina 2 – pušači. Bolesnici sa sistoličkim krvnim tlakom od 140 mmHg ili višim i/ili dijastoličkim krvnim tlakom od 90 mmHg ili višim, te bolesnici koji su trenutno pod antihipertenzivnom terapijom su definirani kao bolesnici s hipertenzijom (65). Ispitanicima sa šećernom bolešću smatrani su sljedeći ispitanici: oni kojima je otprije dijagnosticirana šećerna bolest tipa 1 ili 2, zatim oni ispitanici kojima je kod najmanje dva slučajna određivanja utvrđena koncentracija glukoze >11,1 mmol/L ili su im koncentracije glukoze natašte >7,0 mmol/L, ili su na standardnoj oralnoj terapiji za snižavanje koncentracije glukoze u krvi ili na inzulinu (66). Hiperlipidemija je kategorizirana prema prethodnim podacima iz povijesti bolesti bolesnika kao odsutnost hiperlipidemije - skupina 0; skupina 1-hiperkolesterolemija; skupina 2-hipertrigliceridemija;

skupina 3 – hiperkolesterolemija i hipertrigliceridemija. Podaci koji su se odnosili na primanje terapije za demenciju podijeljeni su u sljedeće kategorije: skupina 0 – bez terapije; skupina 1 – terapija inhibitorima kolinesteraze; skupina 2 – terapija memantinom i skupina 3 – kombinirana terapija inhibitorima kolinesteraze i memantinom.

### 3.2 Metode

Kompjuterizirana tomografija mozga (engl. brain multi-slice computed tomography (MSCT) (Siemens, Njemačka) je provedena kao dio rutinskih dijagnostičkih postupaka kod svih ispitanika, osim kod kontrolnih. Nalaze MSCT-a je interpretirao neuroradiolog koji nije bio informiran o drugim nalazima bolesnika. Nalazi su grupirani u kategorije 0 - uredan nalaz; 2 – atrofične promjene, 3 – atrofične promjene i vaskularne lezije i 4 – vaskularne lezije. Pretraga Colour Doppler Flow Imaging (CDFI) karotidnih arterija je provedena na svim ispitanicima korištenjem uređaja Aloka ProSound-5500 (Aloka Co.Ltd., Tokyo, Japan) (67). Nalazi su stupnjevani kao 0 - uredan nalaz; 2 - početna stenoza (do 59%), 3 – umjerena stenoza (60 – 69%) i 4 – značajna stenoza (70% i više). Pomoću CDFI određeni su zadebljanje intime i medije (engl. intima media thickness (IMT)),  $\beta$  indeks krutosti (engl.  $\beta$  stiffness index, BSI), AI (engl. augmentation index) i CDc (engl. carotid diameter change). Zadebljanje intime i medije je parametar koji služi liječnicima za procjenu ranih stadija ateroskleroze i za praćenje uspjeha terapije koja je primijenjena za usporavanje aterosklerotskog procesa kod bolesnika (68).  $\beta$  indeks krutosti je parametar dobiven računskim putem iz dijametra žile i vrijednosti krvnog tlaka. BSI odražava elastičnost stijenki krvnih žila i efikasan je pokazatelj subkliničke ateroskleroze (69). AI predstavlja računski parametar dobiven iz neurosonoloških vrijednosti povezanih s krvnim tlakom (engl. blood pressure waveform) i krutosti žile. AI je koristan prediktor nepoželjnog kardiovaskularnog ishoda. Rastezljivost karotide se procjenjuje pomoću promjene dijametra karotide (CDc) i također je pokazatelj kardiovaskularnog rizika. Povećana krutost stijenke karotide uzrokuje smanjenje njene rastezljivosti.

Dodatno je provedena transkranijaska Doppler sonografija (korištenjem TCD Viasys Healthcare s 2 MHz sandom, Madison, Wisconsin, Sjedinjene Američke Države) u svrhu procjene indeksa zadržavanja daha (engl. breath holding index, BHI) kao markera cerebrovaskularne vazoreaktivnosti. Povećanje CO<sub>2</sub> u krvi, nastalo zadržavanjem daha, rezultira u vazodilatacijskoj reakciji. Intenzitet reakcije se mjeri pomoću BHI. Postupak se provodi tako da se ispitanika uputi da zadrži dah što duže može (minimalno 30 sekundi), pri čemu se bilježi

srednja brzina strujanja krvi (SBSK) u srednjoj moždanoj arteriji (lat. arteria cerebri media) tijekom apneje i tijekom normoventilacije. Potom se BHI računa kao relativni porast SBSK tijekom apneje, prema formuli:  $(\text{SBSK pri apneji} - \text{SBSK pri normoventilaciji}) / (\text{SBSK pri normoventilaciji} \times t \text{ apneje})$ , gdje t označava vrijeme u sekundama. Jedinice kojima se izražava BHI su %/s, a normalna vrijednost BHI iznosi  $1,2 \pm 0,6 \text{ \%}/s$  (70).

Za procjenu kognitivnih sposobnosti kod svih ispitanika je korišten test Mini Mental State Examination (MMSE) i standardizirana hrvatska verzija testa Montreal Cognitive Assessment (MoCA) (71). Maksimalni broj bodova za test MMSE iznosi 30, 20-24 boda upućuje na blagu demenciju, 10-20 bodova na umjerenu, a manje od 10 bodova na teški oblik demencije. MoCA test ima maksimalni broj bodova 30, ali se najčešće koristi bodovna granica od 26 bodova koja govori za MCI. Neurosonološka mjerenja i procjenu kognitivnih sposobnosti je proveo iskusni neurolog koji je educiran u području vaskularnog ultrazvuka i neuropsihološke procjene.

Kod svakog ispitanika je provedeno uzorkovanje krvi u serumsku epruvetu. Rutinski biokemijski testovi provedeni su za svakog ispitanika: glukoza, mokraćna kiselina, kolesterol, trigliceridi, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol i CRP. Analize su izvedene na automatskom biokemijskom analizatoru Beckman Coulter 2700 (Beckman Coulter Inc, Brea, CA, Sjedinjene Američke Države) korištenjem originalnih reagensa (Beckman Coulter Biomedical Limited Co, Clare, Irska). Nakon što su provedene rutinske biokemijske analize, alikvoti ostatnog seruma su odmah pohranjeni na  $-20^{\circ}\text{C}$  za određivanje koncentracije **KLK6**, **CLU**, **ADPN** i **IL-6**. Uzorci su analizirani neposredno nakon otapanja i nisu ponovo zamrzavani za naknadno testiranje.

### 3.2.1 Određivanje koncentracije interleukina - 6

Koncentracija **IL-6** je određena pomoću reagensa **IL-6** (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka) na imunokemijskom analizatoru Cobas e411 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka). Prva inkubacija provodi se tako da se 30  $\mu\text{L}$  uzorka inkubira s biotiniranim monoklonskim antitijelom specifičnim za **IL-6**. Druga inkubacija provodi se nakon dodatka monoklonskog antitijela specifičnog za **IL-6** koji je obilježen s kompleksom rutenija i mikročestica koje su presvučene sa streptavidinom. Dodana antitijela tvore „sandwich“ kompleks s antigenom iz uzorka.

Reakcijska smjesa se aspirira u mjernu ćeliju analizatora gdje se mikročestice magnetski vežu na površinu elektrode. Nevezane supstance se zatim uklanjaju. Primjena napona na elektrodi

inducira kemiluminescentnu emisiju koja se mjeri fotomultiplikatorom. Rezultati se dobivaju pomoću kalibracijske krivulje (72). Kontrola kvalitete je provedena s Preci Control Multimarker 1 i 2 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka). Deklarirana nepreciznost izražena koeficijentom varijacije (engl. coefficient of variation, CV) iznosila je 1,4% za koncentraciju **IL-6** od 38,3 pg/mL i 1,4% za koncentraciju od 229 pg/mL.

### 3.2.2 Određivanje koncentracije adiponektina

Određivanje koncentracije **ADPN** provedeno je korištenjem imunoturbidimetrijskog testa **ADPN** (Adiponectin, Randox, Crumlin, Velika Britanija) na automatskom biokemijskom analizatoru Beckman Coulter AU 680 (Beckman Coulter Inc, Brea, CA, Sjedinjene Američke Države). Reagens se sastoji od pufera (reagens 1) i čestica lateksa s antitijelom (reagens 2) (73). Kontrola kvalitete provedena je korištenjem Adiponectin Control - Level 2 (**ADPN** Control 2) (Randox Laboratories Limited, Crumlin, Velika Britanija) i Adiponectin Control - Level 3 (**ADPN** Control 3) (Randox Laboratories Limited, Crumlin, Velika Britanija). Vrijednosti za nepreciznost unutar serije (CV) za **ADPN** su bile 2,0% za koncentraciju 4,0 µg/mL i 3,4% za koncentraciju **ADPN** od 9,6 µg/mL.

### 3.2.3 Određivanje koncentracije klasterina

Koncentracija **CLU** je određena ručno pomoću reagensa **CLU** Human Clusterin ELISA (BioVendor-Laboratorni medicina as., Brno, Češka Republika). Standardi, materijali za kontrolu kvalitete i uzorci su se inkubirali u mikrotitarskim jažicama koje su presvučene s monoklonskim anti-human klasterin antitijelima (74). Slijedila je inkubacija u trajanju od 60 minuta, zatim se provodilo ispiranje jažica i sekundarno monoklonsko anti-human klasterin antitijelo obilježeno biotinom se dodalo i inkubiralo s vezanim klasterinom 60 minuta. Jažice su se ispirale i dodan je konjugat s streptavidinom i HRP (engl. horseradish peroxidase). Slijedila je inkubacija od 30 minuta i zadnji korak ispiranja, a ostatni konjugat je reagirao s otopinom supstrata (TMB, tetrametilbenzidin). Reakcija je prekinuta dodavanjem kisele otopine i mjerena je absorbancija nastalog žutog produkta pomoću Elisa HumaReadera (Human, Magdeburg, Njemačka). Absorbancija je proporcionalna koncentraciji klasterina. Standardna krivulja je dobivena upisivanjem vrijednosti absorbancije nasuprot vrijednostima koncentracije pripadajućih standarda. Koncentracija uzoraka je očitana korištenjem standardne krivulje. Serumi su pripremljeni prije izvođenja analize tako da su razrijeđeni 3000x s puferom za razrjeđivanje. Postupak razrjeđivanja proveden je u 2 stupnja: 50x (5 µL uzorka u 245 µL

pufera za razrjeđivanje) i tako razrijeđeni uzorak je razrijeđen još 60x (5µL razrijeđenog uzorka u 295 µL pufera za razrjeđivanje). Granica detekcije testa (engl. limit of detection, LOD) iznosila je 0,5 ng/mL, a gornja granica mjernog raspona bila je 160 ng/mL. Deklarirana nepreciznost unutar serije (CV), za koncentraciju 68,0 µg/mL je iznosila 7%, a za koncentraciju 103,6 µg/mL 5,4%.

### 3.2.4 Određivanje koncentracije neurozina (humanog kalikreina 6)

Uzorci seruma za određivanje koncentracije **KLK6** su bili transportirani pomoću ekspresne dostave na suhom ledu u suradnu ustanovu - Department of Pathology and Laboratory Medicine u Mount Sinai Hospital u Torontu (Kanada). Koncentracija **KLK6** je određena pomoću in-house ELISA metode. Unutarlaboratorijska nepreciznost (CV) za **KLK6** test određena je u laboratoriju i iznosila je 5% za koncentracijski raspon od 0,05 – 0,5 ng/mL.

Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu dalo je pristanak za izvođenje istraživanja. Svaki ispitanik je potpisao informirani pristanak.

## 3.3 Statistička analiza

Naše istraživanje je imalo snagu od 80% ( $\alpha$  od 0,05) za detekciju minimalne razlike od 0,9 ng/mL, 7,0 µg/mL i 3,3 µg/mL za **KLK6**, **CLU** i **ADPN**. Svi podaci su testirani na normalnost razdiobe pomoću Kolmogorov-Smirnov testa. Oni podaci koji su pratili normalnu razdiobu prikazani su kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Podaci koji nisu pratili normalnu razdiobu prikazani su kao medijan i interkvartilni raspon (engl. interquartile range, IQR) od prvog do trećeg kvartila.

Kategorički podaci su testirani pomoću hi-kvadrat testa. Kod frekvencija <5 smo proveli sažimanje skupina da bismo zadovoljili kriterije potrebne za obradu podataka pomoću hi-kvadrat testa. Kvantitativni podaci su testirani pomoću Kruskal-Wallis testa u slučajevima kad podaci nisu pratili normalnu razdiobu u jednom od setova podataka. Jednosmjerna analiza varijance ANOVA se koristila za one skupine podataka koje su pratile normalnu razdiobu. Razina statističkog značenja je postavljena na  $< 0,05$ .

Spearmanov koeficijent korelacije se koristio za analizu povezanosti podataka koji ne prate normalnu razdiobu i Pearsonova korelacija za podatke koji prate normalnu razdiobu.

Bonferronijeva korekcija je izvedena za višestruko testiranje (engl. multiple testing) kod analize povezanosti. Za analizu povezanosti vrijednost  $P < 0,001$  se smatrala statistički značajnom.

Statistička obrada je provedena pomoću programa MedCalc Statistical Software, verzija 13.3.3 (MedCalc statistical Software, Ostend, Belgium).

Svi postupci i mjerenja koja su provodili liječnici i suradnici iz drugih ustanova u poglavlju Rezultati su označeni znakom §.

## 4 REZULTATI

Tijekom perioda od studenog 2010. do travnja 2014. godine obrađen je ukupno 241 ispitanik. Šest ispitanika je isključeno iz istraživanja zbog sljedećih razloga: jedan ispitanik je isključen zbog nezadovoljavajuće kvalitete uzorka seruma uslijed hemolize, nedovoljna količina uzorka je bila razlog isključivanja za dva ispitanika, a tri ispitanika su imala povećane koncentracije CRP ( $> 32$  mg/L). Nakon eliminiranja isključenih ispitanika, konačan broj je bio 235. Skupina zdravih ispitanika podijeljena je na dvije skupine zbog činjenice da neke osobe starije od 60 godina pokazuju simptome blagog kognitivnog poremećaja.

U skupini demografskih podataka, statistički značajne razlike između skupina ispitanika su nađene za dob, indeks tjelesne mase i duljinu trajanja obrazovanja (Tablica 1).

Tablica 1. Demografske karakteristike ispitivanih skupina

Skupina	AD (N=70)	VAD (N=67)	MCI (N=48)	KZI (N=50)	P*
Dob (godine) (medijan i raspon)	74 (69-79)	78 (70-82)	72 (68-76)	66 (63-73)	<b>&lt;0,001</b>
Žene (N/udio)	43/0,61	40/0,60	31/0,65	30/0,60	0,321
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26 (3-27)	25 (23-26)	26 (25-27)	27 (25-30)	<b>&lt;0,001</b>
Broj godina obrazovanja	10 (8-12)	10 (8-12)	12 (10-13)	12 (12-15)	<b>&lt;0,001</b>
Hipertenzija (N/udio)	47/0,67	60/0,90	32/0,67	30/0,60	<b>0,002</b>
Terapija statinima (N/udio)	20/0,29	30/0,45	24/0,50	13/0,26	<b>0,019</b>
Pušenje (N (pušači)/udio)	19/0,27	25/0,37	19/0,40	7/0,14	<b>0,036</b>

AD - Alzheimerova bolest; VAD - vaskularna demencija; MCI - blagi kognitivni poremećaj; KZI - kognitivno zdravi ispitanici ; BMI - indeks tjelesne mase

\*Kategorički podaci su testirani pomoću hi-kvadrat testa. Kruskal-Wallis test je korišten za kvantitativne podatke koji nisu pratili normalnu razdiobu u jednom od setova podataka. Jednosmjerna analiza varijance ANOVA se koristila za one skupine podataka koje su pratile normalnu razdiobu. P vrijednosti  $< 0,05$  su istaknute.

Kako je prikazano u Tablici 1, ispitanici iz skupine s dijagnozom vaskularne demencije su bili najstariji (medijan dobi je iznosio 78 godina), dok su ispitanici koji su pripadali kontrolnoj

skupini kognitivno zdravih ispitanika bili najmlađi s medijanom dobi od 66 godina. Bolesnici s dijagnozom vaskularne demencije su imali najniži indeks tjelesne mase, dok su ispitanici iz drugih skupina imali slične vrijednosti. Ispitanici iz skupine kognitivno zdravih kontrolnih ispitanika imali su veći broj godina obrazovanja od onih ispitanika koji su pripadali skupinama s dijagnozom AD, odnosno VAD.

Najveći udio ispitanika s hipertenzijom i fibrilacijom atrijsa nađen je u skupini bolesnika s dijagnozom VAD. Kod podataka koji su se odnosila na čimbenike rizika poput pušenja, hipertenzije i fibrilacije atrijsa nađene su značajne razlike između ispitivanih skupina. Za analizu podataka hi-kvadrat testom koji se odnose na šećernu bolest, terapiju oralnim hipoglikemicima, terapiju inzulinom, koronarnu bolest, fibrilaciju atrijsa, antikoagulantnu terapiju (Tablica 2) i hiperlipidemiju (Tablica 3) zbog niskih frekvencija u pojedinim skupinama ujedinjeno su podaci skupine s MCI i kognitivno zdravih ispitanika u kontrolnu skupinu.

Tablica 2. Prikaz podataka o zastupljenosti šećerne bolesti i koronarne bolesti u skupinama ispitanika

Skupina	AD (N=70)	VAD (N=67)	Kontrolna skupina MCI i KZI (N=98)	P*
Šećerna bolest (N/udio)	5/0,07	9/0,13	15/0,15	0,396
Terapija oralnim hipoglikemicima (N/udio)	3/0,04	5/0,07	8/0,08	0,597
Terapija inzulinom (N/udio)	1/0,01	1/0,01	1/0,01	0,957
Koronarna bolest (N/udio)	7/0,10	11/0,16	10/0,10	0,404
Fibrilacija atrijsa (N/udio)	9/0,13	17/0,25	9/0,09	<b>0,014</b>
Antikoagulantna terapija	2/0,03	10/0,15	6/0,06	<b>0,023</b>

AD - Alzheimerova bolest; VAD - vaskularna demencija; MCI - blagi kognitivni poremećaj;  
KZI - kognitivno zdravi ispitanici

\*Podaci su testirani pomoću hi-kvadrat testa. Za potrebe statističke obrade, podaci za MCI i kognitivno zdrave ispitanike su ujedinjeno u kontrolnu skupinu.



Tablica 3. Prikaz podataka o zastupljenosti hiperlipidemije u pojedinim skupinama ispitanika

Skupina	AD (N=70)	VAD (N=67)	Kontrolna skupina (MCI i KZI) (N=98)	P*
Skupina 0 (ispitanici koji nemaju hiperkolesterolemiju ni hipertrigliceridemiju)	45/0,64	34/0,51	50/0,51	<b>0,003</b>
Skupina 1 (ispitanici s hiperkolesterolemijom ili hipertrigliceridemijom)	21/0,30	12/0,18	21/0,21	
Skupina 3 (ispitanici s hiperkolesterolemijom i hipertrigliceridemijom)	4/0,06	21/0,31	27/0,28	

AD - Alzheimerova bolest; VAD - vaskularna demencija; MCI - blagi kognitivni poremećaj; KZI - kognitivno zdravi ispitanici

\*Podaci su testirani pomoću hi-kvadrat testa. Za potrebe statističke obrade, podaci za MCI i kognitivno zdrave ispitanike su ujedinjeni u kontrolnu skupinu.

Za dijagnozu koronarne bolesti nije utvrđena statistički značajna razlika između ispitivanih skupina (Tablica 2). Za terapiju antikoagulantnim lijekovima nađena je statistički značajna razlika u frekvencijama ispitanika (Tablica 2), s tim da je najveći udio ispitanika koji uzimaju antikoagulantnu terapiju bio u skupini s dijagnozom VAD. Za dijagnozu šećerne bolesti i terapiju oralnim hipoglikemicima nisu utvrđene značajne razlike (Tablica 2). Udio ispitanika s dijagnozom šećerne bolesti koji su na terapiji inzulinom nije se razlikovao i iznosio je 0,01 za ispitivane skupine.

Značajna razlika postoji između skupina obzirom na hiperlipidemiju (Tablica 3). Najveći udio ispitanika s koncentracijom kolesterola i triglicerida unutar referentnog intervala bio je zastupljen u kontrolnoj skupini koja se, zbog sažimanja podataka, sastojala od kognitivno zdravih ispitanika i onih s blagim kognitivnim poremećajem.

Tablica 4 prikazuje podatke o vrsti terapije koja je primijenjena u skupinama pacijenata s dijagnozom AD, odnosno VAD.

Tablica 4. Prikaz podataka o primijenjenoj terapiji u skupinama pacijenata s dijagnozom Alzheimerove bolesti (AD) i vaskularne demencije (VAD).

Terapija	AD (N=70)	VAD (N=67)
Bez terapije	31	33
Inhibitor kolinesteraze	11	2
Memantin	17	25
Kombinacija inhibitora kolinesteraze i memantina	11	7

Značajna razlika u koncentraciji rutinskih biokemijskih analiza između ispitivanih skupina zabilježena je samo za mokraćnu kiselinu i CRP (Tablica 5). Skupina kognitivno zdravih ispitanika je imala najveću koncentraciju mokraćne kiseline. Najniža koncentracija mokraćne kiseline nađena je u kod pacijenata s dijagnozom AD (Tablica 5, Slika 6).

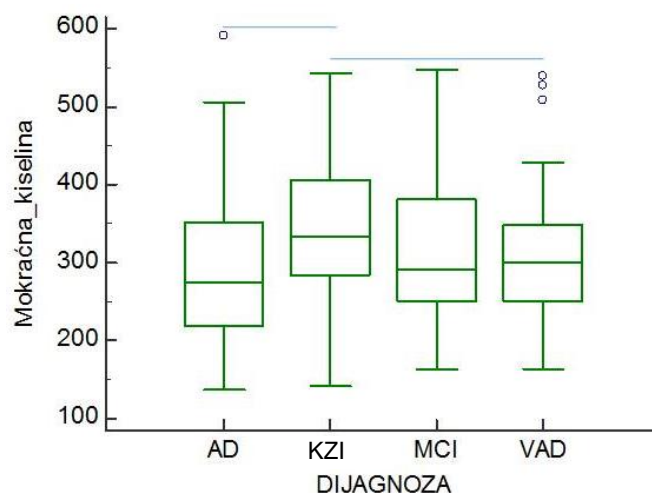
Post-hoc testom utvrđena je razlika u koncentraciji mokraćne kiseline ( $P < 0,05$ ) između skupine ispitanika s AD i kognitivno zdravih ispitanika, te između skupine ispitanika s dijagnozom VAD i kognitivno zdravih ispitanika.

Medijan koncentracije CRP-a bio je najveći u skupini kognitivno zdravih ispitanika, dok je najniži bio u skupini bolesnika s dijagnozom AD (Tablica 5, Slika 7). Post-hoc testom utvrđene su razlike u koncentraciji CRP-a između skupina bolesnika s AD i kognitivno zdravih ispitanika i ispitanika s MCI i kognitivno zdravih ispitanika.

Tablica 5. Nalazi rutinskih biokemijskih testova za ispitivane skupine

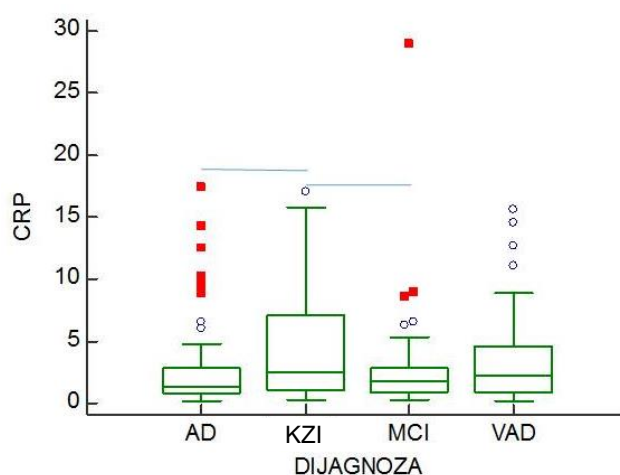
Skupina	AD (N=70)	VAD (N=67)	MCI (N=48)	KZI (N=50)	P*
Glukoza (mmol/L)	5,4 (5,1-6,1)	5,4 (4,9-6,2)	5,7 (5,1-6,9)	5,7 (5,2-6,2)	0,416
Mokraćna kiselina (μmol/L)	274 (218-352)	299 (251-349)	291 (251-381)	334 (284-406)	<b>0,011</b>
Kolesterol (mmol/L)	5,8±1,3	5,4±1,3	5,4±1,2	5,9±1,4	0,060
Trigliceridi (mmol/L)	1,4 (1,1-1,9)	1,4 (1,1-1,8)	1,4 (1,0-1,8)	1,4 (1,1-1,9)	0,698
HDL-kolesterol (mmol/L)	1,4 (1,1-1,7)	1,4 (1,2-1,6)	1,4 (1,2-1,7)	1,4 (1,2-1,6)	0,964
LDL-kolesterol (mmol/L)	3,6±1,2	3,3±1,2	3,3±1,0	3,8±1,1	0,066
CRP (mg/L)	1,3 (0,8-2,8)	2,2 (0,9-4,6)	1,8 (0,9-2,8)	2,5 (1,1-7,1)	<b>0,027</b>

\* Kruskal-Wallis test je korišten za kvantitativne podatke koji nisu pratili normalnu razdiobu u jednom od setova podataka. Jednosmjerna analiza varijance ANOVA se koristila za one skupine podataka koje su pratile normalnu razdiobu. P vrijednosti < 0,05 su istaknute.



Slika 6. Koncentracija mokraćne kiseline ispitanika s raznim vrstama demencije i kognitivno zdravih ispitanika. Grafikon okvira s ručicama koji prikazuje Kruskal – Wallis – ov test razlike između skupina ispitanika za koncentraciju mokraćne kiseline.

Bijeli kružići iznad ručica predstavljaju vrijednosti iznad gornjeg kvartila koje premašuju vrijednosti za 1,5 puta interkvartilni raspon. Plave crte iznad pojedinih okvira s ručicama predstavljaju rezultate post-hoc testa koji pokazuju razliku između skupina sa statističkim značenjem  $P < 0,05$



Slika 7. Koncentracija CRP-a ispitanika s raznim vrstama demencije i kognitivno zdravih ispitanika. Grafikon okvira s ručicama koji prikazuje Kruskal – Wallis – ov test razlike između skupina ispitanika za koncentraciju CRP-a.

Bijeli kružići iznad ručica predstavljaju vrijednosti iznad gornjeg kvartila koje premašuju vrijednosti za 1,5 puta interkvartilni raspon. Crveni kružići iznad ručica predstavljaju vrijednosti iznad gornjeg kvartila koje premašuju trostruku vrijednost interkvartilnog raspona. Plave crte iznad pojedinih okvira s ručicama predstavljaju rezultate post-hoc testa koji pokazuju razliku između skupina sa statističkim značenjem  $P < 0,05$ .

Tablica 6 prikazuje zastupljenost nalaza CDFI (engl. Colour Doppler Flow Imaging) karotidnih arterija u ispitivanim skupinama, a tablica 7 prikazuje zastupljenost nalaza kompjuterizirane tomografije mozga u skupinama pacijenata s dijagnozom AD, VAD i blagog kognitivnog poremećaja. Najveći udio početne, umjerene i značajne stenoze zabilježen je u skupini bolesnika s VAD (Tablica 6). Nalaz CT-a koji pokazuje atrofične promjene i vaskularne lezije bio je također najviše zastupljen u skupini s dijagnozom VAD (Tablica 7).

Tablica 6. Prikaz zastupljenosti nalaza CDFI (engl. Colour Doppler Flow Imaging) karotidnih arterija u ispitivanim skupinama (§)

Nalaz CDFI	AD (N=70)	VAD (N=67)	MCI (N=48)	KZI (N=50)
0 N/udio	44/0,63	35/0,52	34/0,71	48/0,96
2 N/udio	25/0,36	27/0,40	12/0,25	2/0,04
3 N/udio	1/0,01	4/0,06	0/0,00	0/0,00
4 N/udio	0/0,00	1/0,01	2/0,04	0/0,00

(§) analize CDFI je proveo iskusni specijalist neurologije; AD - Alzheimerova bolest; VAD - vaskularna demencija; MCI - blagi kognitivni poremećaj; KZI - kognitivno zdravi ispitanici; 0 - uredan nalaz; 2 - početna stenoza (do 59%); 3 - umjerena stenoza (60% -69%); 4 - značajna stenoza (više od 70%).

Tablica 7. Nalazi kompjuterizirane tomografije (CT) mozga u skupinama pacijenata s dijagnozom Alzheimerove bolesti, vaskularne demencije i blagog kognitivnog poremećaja (§)

Nalaz CT	AD (N=70)	VAD (N=67)	MCI (N=48)
0 N/udio	2/0,03	0/0,00	17/0,35
2 N/udio	49/0,70	0/0,00	2/0,04
3 N/udio	19/0,27	29/0,43	18/0,38
4 N/udio	0/0,00	38/0,57	11/0,23

(§) analize CT je proveo iskusni specijalist radiologije; AD - Alzheimerova bolest; VAD - vaskularna demencija; MCI - blagi kognitivni poremećaj. 0 - uredan nalaz; 2 - atrofične promjene; 3 - atrofične promjene i vaskularne lezije; 4 - vaskularne lezije.

Za sve neurosonološke testove utvrđene su značajne razlike između skupina ispitanika (Tablica 8). Kod bolesnika s VAD su IMT i BSI bili najveći. Prosječna vrijednost BHI je bila najveća u skupini kognitivno zdravih ispitanika. Vrijednosti AI i CDc su također bile najveće u skupini kognitivno zdravih ispitanika (Tablica 8).

Tablica 8. Nalazi neurosonoloških pretraga provedenih na ispitivanim skupinama (§)

Skupina	AD (N=70)	VAD (N=67)	MCI (N=48)	KZI (N=50)	P*
IMT (mm)	1,0 (0,8-1,2)	1,2 (1,1-1,3)	1,2 (1,0-1,3)	0,9 (0,7-1,1)	< <b>0,001</b>
BSI	11,7 (10,7-13,0)	12,6 (11,7-14,0)	11,5 (9,8-15,8)	8,5 (6,8-10,8)	< <b>0,001</b>
BHI (%/s)	1,21 (0,95-1,37)	0,89 (0,67-1,16)	1,21 (0,87-1,41)	1,40 (1,28-1,55)	< <b>0,001</b>
AI (%)	25,8 (22,7 – 29,8)	25,6 (22,8-29,1)	24,4 (19,4-29,2)	29,8 (27,9-32,9)	< <b>0,001</b>
CDc (mm)	0,48 (0,43-0,54)	0,44 (0,39-0,47)	0,48 (0,43-0,51)	0,53 (0,50-0,58)	< <b>0,001</b>

(§) neurosonološke pretrage je proveo iskusni specijalist neurologije; AD - Alzheimerova bolest; VAD - vaskularna demencija; MCI - blagi kognitivni poremećaj; KZI - kognitivno zdravi ispitanici; IMT - zadebljanje intime i medije; BSI - beta indeks krutosti; BHI - indeks zadržavanja daha; AI – auscultation index; CDc – carotid diameter change.

\* Kruskal-Wallis test je korišten za kvantitativne podatke koji nisu pratili normalnu razdiobu u jednom od setova podataka. P vrijednosti  $<0,05$  su istaknute.

Post-hoc analiza je pokazala razlikovanje između svih skupina ispitanika za IMT, BSI, BHI i CDc, dok je kod AI nađena razlika između skupina s dijagnozom AD i VAD, te između skupine s blagim kognitivnim poremećajem i VAD.

Tablica 9 prikazuje rezultate analize razlike između skupina ispitanika za provedene neuropsihološke testove MMSE i MoCA. Za oba testa nađena je statistički značajna razlika između skupina. Kod testa MMSE, bolesnici s dijagnozom AD i VAD su imali sličan broj bodova. Ispitanici iz kontrolne skupine, bilo da su pripadali MCI skupini ili skupini kognitivno zdravih, imali su znatno veći broj bodova. Rezultati MoCA testa su bili heterogeniji kod ispitivanih skupina zbog njegove osjetljivosti za MCI: bolesnici s dijagnozom AD i VAD su imali sličan broj bodova (13, odnosno 15), ispitanici s blagim kognitivnim poremećajem su imali viši (22 boda), a kognitivno zdravi ispitanici najviši broj bodova (29). Post-hoc analizom nađene su značajne razlike između svih skupina ispitanika.

Tablica 9. Nalazi neuropsiholoških testova provedenih na ispitivanim skupinama (§)

Skupina	AD (N=70)	VAD (N=67)	MCI (N=48)	KZI (N=50)	P*
MMSE	18 (13-21)	19 (15-23)	27 (26-29)	30 (28-30)	<b>&lt; 0,001</b>
MoCA	13 (8-16)	15 (9-18)	22 (20-24)	29 (27-30)	<b>&lt; 0,001</b>

(§) neuropsihološke testove je proveo iskusni specijalist neurologije; AD-Alzheimerova bolest; VAD-vaskularna demencija; MCI-blagi kognitivni poremećaj; KZI-kognitivno zdravi ispitanici; MMSE - Mini-Mental State Examination; MoCA – Montreal Cognitive Assessment.

\* Kruskal-Wallis test je korišten za kvantitativne podatke koji nisu pratili normalnu razdiobu u jednom od setova podataka. P vrijednosti  $< 0,05$  su istaknute.

Rezultati testiranja razlika u koncentracijama upalnog biljega **IL-6** i ispitivanih biljega demencije – **KLK6**, **ADPN** i **CLU** između skupina ispitanika prikazani su u tablici 10. Koncentracija upalnog biljega **IL-6** značajno se razlikovala između ispitivanih skupina (Slika 8).

Post-hoc analiza pokazala je razliku u koncentraciji **IL-6** između skupina s dijagnozom VAD i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem i između skupina bolesnika s AD i VAD. Za koncentracije ispitivanih potencijalnih biljega demencije – **ADPN**, **CLU** i **KLK6** nije nađena statistički značajna razlika između skupina ispitanika (Tablica 10, Slike 9-11). Nakon što je provedena korekcija prema dobi, dobivene P-vrijednosti nisu ukazivale na statistički značajnu razliku (**KLK6** P = 0,328; **ADPN** P = 0,497; **CLU** P = 0,253). Isto tako, nakon provedene korekcije prema spolu, P-vrijednosti su bile iznad razine značajnosti (**KLK6** P = 0,263; **ADPN** P = 0,428; **CLU** P = 0,299).

Tablica 10. Koncentracije upalnog biljega **IL-6** i potencijalnih biljega demencije u ispitivanim skupinama.

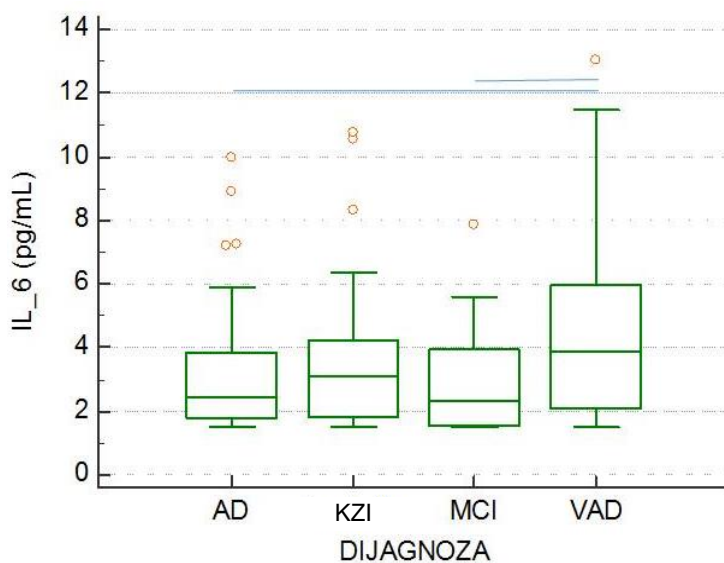
Biljeg	AD (N=70)	VAD (N=67)	MCI (N=48)	KZI (N=50)	P*
<b>IL-6</b> (pg/mL)	2,7 (1,9-5,0)	4,1 (2,1-6,4)	2,3 (1,5-4,0)	3,2 (1,9-4,5)	<b>0,014</b>
<b>ADPN</b> (µg/mL)	10,6 (8,4-13,8)	10,3 (7,0-13,4)	10,4 (7,7-14,8)	8,8 (5,8-13,3)	0,268
<b>CLU</b> (µg/mL)	42,2±15,0	37,0±14,7	41,8±16,3	40,5±12,8	0,178
<b>KLK6</b> (§) (ng/mL)	2,9 (2,3-3,4)	2,7 (2,3-3,3)	2,6 (2,1-2,9)	2,8 (2,3-3,3)	0,137

CRP = C-reaktivni protein; **IL-6** = interleukin-6; **ADPN** = adiponektin; **CLU** = klasterin; **KLK6** = humani kalikrein 6. AD-Alzheimerova bolest; VAD-vaskularna demencija; MCI-blagi kognitivni poremećaj; KZI -kognitivno zdravi ispitanici.

\* Kruskal-Wallis test je korišten za kvantitativne podatke koji nisu pratili normalnu razdiobu u jednom od setova podataka. Jednosmjerna analiza varijance ANOVA se koristila za one skupine podataka koje su pratile normalnu razdiobu. P vrijednosti <0,05 su istaknute.



Kako je prikazano na slici 8, najveći medijan koncentracije utvrđen je u skupini bolesnika s dijagnozom VAD, a najmanji u kontrolnoj skupini koja je bila sastavljena od ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem. Nadalje, u skupini ispitanika s VAD, raspodjela koncentracija **IL-6** bila je najšira.

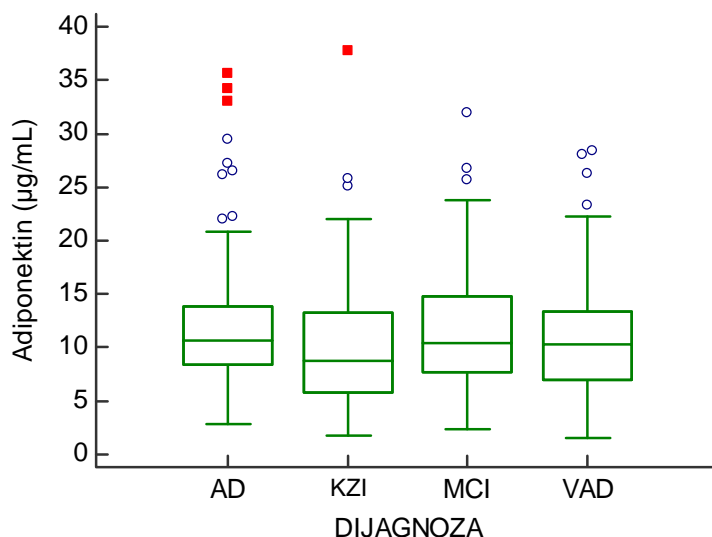


Slika 8. Koncentracija interleukina – 6 (**IL-6**) ispitanika s raznim vrstama demencije i kognitivno zdravih ispitanika. Grafikon okvira s ručicama koji prikazuje Kruskal – Wallis – ov test razlike između skupina ispitanika za **IL-6**.

**IL-6** – interleukin-6; AD-Alzheimerova bolest; VAD-vaskularna demencija; MCI-blagi kognitivni poremećaj; KZI - kognitivno zdravi ispitanici. Bijeli kružići iznad ručica predstavljaju vrijednost iznad gornjeg kvartila koje premašuju vrijednosti za 1,5 puta interkvartilni raspon. Crveni kružići iznad ručica predstavljaju vrijednosti iznad gornjeg kvartila koje premašuju trostruku vrijednost interkvartilnog raspona.

Koncentracije koje izrazito odstupaju su isključene iz analize radi preglednosti grafikona. Plave crte iznad pojedinih okvira s ručicama predstavljaju rezultate post-hoc testa koji pokazuju razliku između skupina sa statističkim značenjem  $P < 0,05$ .

Kako se vidi na slici 9, osim nekoliko ekstremnih vrijednosti, u skupini KZI su prevladavale niže koncentracije ADPN, iako razlika između ispitivanih skupina nije bila statistički značajna.

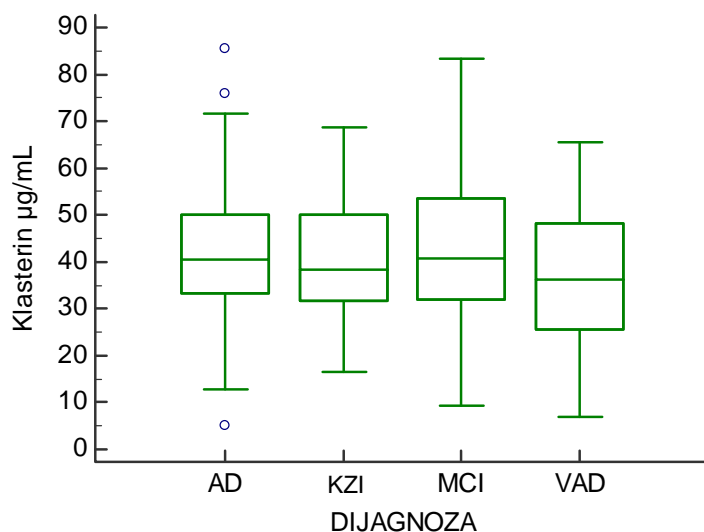


Slika 9. Koncentracija adiponektina (**ADPN**) ispitanika s raznim vrstama demencije i kognitivno zdravih ispitanika. Grafikon okvira s ručicama koji prikazuje Kruskal – Wallis – ov test razlike između skupina ispitanika za **ADPN**.

**ADPN** – adiponektin; AD-Alzheimerova bolest; VAD-vaskularna demencija; MCI-blagi kognitivni poremećaj; KZI - kognitivno zdravi ispitanici. Bijeli kružići iznad ručica predstavljaju vrijednost iznad gornjeg kvartila koje premašuju vrijednosti za 1,5 puta interkvartilni raspon. Crveni kružići iznad ručica predstavljaju vrijednosti iznad gornjeg kvartila koje premašuju trostruku vrijednost interkvartilnog raspona.

Koncentracije koje izrazito odstupaju su isključene iz analize radi preglednosti grafikona.

Na slici 10, vidljivo je da je u sve četiri skupine pronađen vrlo veliki raspon izmjerenih koncentracija **CLU**, te da su medijani skupina i njihovi rasponi usporedivi.

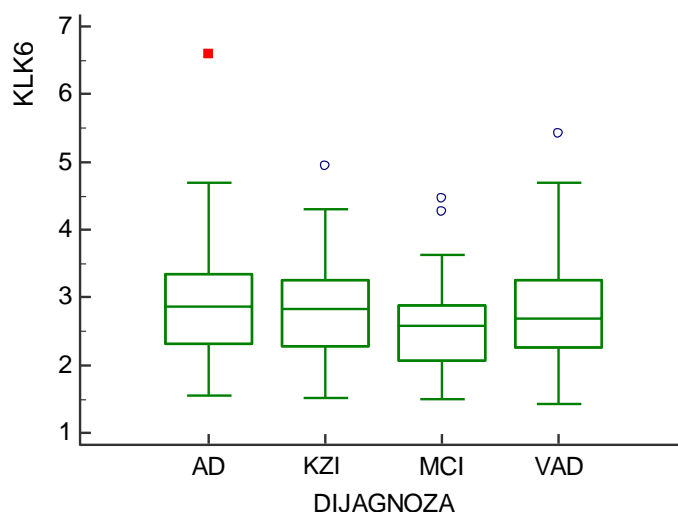


Slika 10. Koncentracija klasterina (**CLU**) ispitanika s raznim vrstama demencije i kognitivno zdravih ispitanika. Grafikon okvira s ručicama koji prikazuje Kruskal – Wallis – ov test razlike između skupina ispitanika za klasterin.

AD-Alzheimerova bolest; VAD-vaskularna demencija; MCI-blagi kognitivni poremećaj; KZI - kognitivno zdravi ispitanici.

Bijeli kružići iznad ručica predstavljaju vrijednost iznad gornjeg kvartila koje premašuju vrijednosti za 1,5 puta interkvartilni raspon.

Na slici 11, vidljivo je da je u skupini ispitanika s **AD** bio jedan bolesnik u kojeg je izmjerena ekstremno visoka koncentracija **KLK6** u serumu. Osim u tog ispitanika, koncentracije **KLK6** su bile vrlo homogene u sve četiri skupine ispitanika i nisu se statistički značajno razlikovale.



Slika 11. Koncentracija humanog kalikreina 6 (**KLK6**) ispitanika s raznim vrstama demencije i kognitivno zdravih ispitanika. Grafikon okvira s ručicama koji prikazuje Kruskal – Wallis – ov test razlike između skupina ispitanika za humani kalikrein 6. (§)

**KLK6**– humani kalikrein 6; AD-Alzheimerova bolest; VAD-vaskularna demencija; MCI-blagi kognitivni poremećaj; KZI - kognitivno zdravi ispitanici.

Bijeli kružići iznad ručica predstavljaju vrijednosti iznad gornjeg kvartila koje premašuju vrijednosti za 1,5 puta interkvartilni raspon. Crveni kružić iznad ručica predstavlja vrijednost iznad gornjeg kvartila koja premašuje trostruku vrijednost interkvartilnog raspona.

Statističkom analizom povezanosti ispitivanih biljega, te upalnih biljega s ostalim kliničkim pokazateljima, nije utvrđena statistički značajna povezanost, osim u slučaju **ADPN**, **IL-6** i C-reaktivnog proteina. Naime, utvrđeno je da je koncentracija **ADPN** slabo negativno povezana s koncentracijom glukoze ( $r = -0,316$ ,  $P < 0,001$ ) i s koncentracijom mokraćne kiseline ( $r = -0,348$ ,  $P < 0,001$ ), te slabo pozitivno s koncentracijom HDL-kolesterola ( $r = 0,379$ ,  $P < 0,001$ ) (Tablica 11). Koncentracija **IL-6** bila je pozitivno povezana s koncentracijom mokraćne kiseline ( $r = 0,323$ ,  $P < 0,001$ ) i negativno s koncentracijom HDL-kolesterola ( $r = -0,275$ ,  $P < 0,001$ ).

0,001). Koncentracija C-reaktivnog proteina bila je slabo pozitivno povezana s koncentracijom mokraćne kiseline ( $r = 0,298$ ,  $P < 0,001$ ). Tablice 12 i 13 prikazuju rezultate analize povezanosti s upalnim biljezima i potencijalnim biljezima demencije za provedene neurosonološke i neuropsihološke testove. Za ispitivane parametre nije utvrđena povezanost s biljezima upale i potencijalnim biljezima demencije.

Tablica 11. Rezultati testiranja povezanosti indeksa tjelesne mase i rutinskih biokemijskih testova s upalnim biljezima i potencijalnim biljezima demencije

Parametar	CRP (mg/L)	<b>IL-6</b> (pg/mL)	<b>ADPN</b> ( $\mu$ g/mL)	<b>CLU</b> ( $\mu$ g/mL)	<b>KLK6</b> (ng/mL)
BMI ( $\text{kg/m}^2$ ) r (P)	0,205 (0,002)	0,149 (0,023)	-0,206 (0,002)	0,064 (0,326)	0,013 (0,841)
Glukoza (mmol/L) r (P)	0,149 (0,022)	0,097 (0,138)	<b>-0,316</b> <b>(&lt;0,001)</b>	-0,068 (0,300)	-0,148 (0,023)
Mokraćna kiselina ( $\mu$ mol/L) r (P)	<b>0,298</b> <b>(&lt;0,001)</b>	<b>0,323</b> <b>(&lt;0,001)</b>	<b>-0,348</b> <b>(&lt;0,001)</b>	0,039 (0,548)*	0,162 (0,013)*
Kolesterol (mmol/L) r (P)	0,004 (0,950)	-0,148 (0,023)	0,140 (0,033)	0,007 (0,921)*	-0,012 (0,858)*
Trigliceridi (mmol/L) r (P)	0,040 (0,545)	0,083 (0,205)	-0,240 (0,0002)	0,024 (0,718)	0,002 (0,972)
HDL-kolesterol (mmol/L) r (P)	-0,194 (0,003)	<b>-0,275</b> <b>(&lt;0,001)</b>	<b>0,379</b> <b>(&lt;0,001)</b>	-0,043 (0,509)	0,035 (0,595)
LDL-kolesterol (mmol/L) r (P)	0,060 (0,361)	-0,090 (0,167)	0,097 (0,139)	0,024 (0,713)*	-0,011 (0,863)*

\* koeficijent korelacije za setove podataka s normalnom razdiobom; r = koeficijent korelacije; CRP = C-reaktivni protein; **IL-6** = interleukin-6; **ADPN** = adiponektin; **CLU** = klasterin; **KLK6** = humani kalikrein 6; BMI = indeks tjelesne mase

Tablica 12. Rezultati testiranja povezanosti rezultata neurosonoloških testova s upalnim biljezima i potencijalnim biljezima demencije

Neurosonološki test	CRP (mg/L)	<b>IL-6</b> (pg/mL)	<b>ADPN</b> (µg/mL)	<b>CLU</b> (µg/mL)	<b>KLK6</b> (ng/mL)
IMT (mm) r (P)	0,077 (0,243)	0,179 (0,006)	-0,005 (0,937)	-0,107 (0,103)	0,093 (0,154)
BSI r (P)	-0,030 (0,647)	0,063 (0,335)	0,122 (0,063)	0,035 (0,590)*	0,103 (0,117)*
BHI %/s r (P)	0,082 (0,314)	-0,094 (0,246)	-0,073 (0,371)	0,194 (0,016)	-0,081 (0,318)
AI r (P)	0,029 (0,662)	0,000 (0,998)	-0,014 (0,835)	-0,022 (0,736)	0,041 (0,537)
CDc r (P)	-0,051 (0,436)	-0,205 (0,002)	-0,002 (0,973)	0,040 (0,546)	-0,127 (0,053)

CRP = C-reaktivni protein; **IL-6** = interleukin-6; **ADPN** = adiponektin; **CLU** = klasterin; **KLK6** = humani kalikrein 6; IMT - zadebljanje intime i medije; BSI - beta indeks krutosti; BHI - indeks zadržavanja daha; AI – auscultation index; CDc – carotid diameter change.

\* koeficijent korelacije za skupine podataka s normalnom razdiobom. Pearsonova korelacija je korištena za skupine podataka s normalnom razdiobom, dok je Spearmanov koeficijent korelacije korišten za one skupine podataka koji ne prate normalnu razdiobu.

Osnovni neurosonološki parametri poput zadebljanja intime i medije, beta indeksa krutosti i indeksa zadržavanja daha ne pokazuju povezanost s upalnim biljegom **IL-6** i mogućim biljezima demencije **ADPN**, **CLU** i **KLK6**.

Tablica 13. Rezultati testiranja povezanosti rezultata neuropsiholoških testova s upalnim biljezima i potencijalnim biljezima demencije

Neuropsihološki test	CRP (mg/L)	<b>IL-6</b> (pg/mL)	<b>ADPN</b> (µg/mL)	<b>CLU</b> (µg/mL)	<b>KLK6</b> (ng/mL)
MMSE r (P)	0,110 (0,093)	-0,085 (0,193)	-0,132 (0,043)	0,032 (0,626)	-0,096 (0,143)
MoCA r (P)	0,106 (0,104)	-0,081 (0,218)	-0,138 (0,035)	0,020 (0,761)	-0,074 (0,262)

CRP - C-reaktivni protein; **IL-6** - interleukin-6; **ADPN** - adiponektin; **CLU** - klasterin; **KLK6** - humani kalikrein 6; MMSE - Mini Mental State Examination; MoCA - Montreal Cognitive Assessment

Najčešće upotrebljavani neuropsihološki testovi za procjenu kognitivnog statusa nisu povezani s pokazateljima upale CRP-om i **IL-6**. Koncentracije biokemijskih biljega **ADPN**, **CLU** i **KLK6** nisu povezane s rezultatima kognitivne procjene ispitanika.

## 5 RASPRAVA

Rezultati našeg istraživanja pokazali su da ne postoji razlika u koncentraciji **KLK6**, **CLU** i **ADPN** u serumu između skupina bolesnika s dijagnozom AD, VAD i skupine kontrolnih ispitanika. Obzirom da neke starije osobe pokazuju znakove kognitivnog propadanja skupina kontrolnih ispitanika iste dobi podijeljena je na one koji pokazuju znakove blagog kognitivnog poremećaja i one koji su kognitivno zdravi. Koncentracija potencijalnih biljega nije povezana s rezultatima dijagnostičkih postupaka koji se provode kao dio standardne neurološke obrade, poput neuropsiholoških testova i neurosonoloških i slikovnih testova. Koncentracija upalnog biljega **IL-6** značajno se razlikovala između ispitivanih skupina, s najvećom koncentracijom u skupini ispitanika s dijagnozom VAD, a najmanjom kod ispitanika s MCI.

Jedan od najvećih javnozdravstvenih problema u svijetu je demencija. Svjetska zdravstvena organizacija upozorava na veliko opterećenje zdravstvenih sustava u budućnosti zbog prognoza vezanih uz povećanje broja slučajeva bolesti i velike troškove vezane uz bolest. Sadašnji procijenjeni troškovi vezani uz demenciju iznose 604 milijarde američkih dolara na godinu, što odgovara 1,0% svjetskog bruto domaćeg proizvoda, ili 0,6% ako se računaju samo direktni troškovi (1).

Prema klasifikaciji Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, preuzetoj od Svjetske zdravstvene organizacije, demencije pripadaju podskupini „Organskih i simptomatskih duševnih poremećaja“ unutar skupine mentalnih/duševnih poremećaja i poremećaja ponašanja (75). Prema podacima iz popisa stanovništva provedenog 2011. godine broj stanovnika starih 65 i više godina u Hrvatskoj iznosio je 758.633, odnosno 17,7% ukupnog stanovništva (76). Od tog broja, veći udio otpada na žene – u dobnoj skupini od 65 – 74 godina 57%, odnosno u skupini 85 i više godina 75%. Stopa hospitalizacija žena starijih od 65 godina u 2013. godini iznosila je 243,6/1000, a za muškarce iste dobi 320,9/1000. U skupini bolesti duševnih poremećaja i poremećaja ponašanja stopa hospitalizacija je iznosila 8,43 za muškarce, odnosno 8,11 za žene (76).

Kod oblikovanja skupina ispitanika s dijagnozom demencije važno je prepoznati one oblike poremećaja kognitivne sposobnosti koji su uzrokovani drugim procesima, a ne neurodegenerativnim ili vaskularnim. Pri tome je važno precizno definiranje kriterija isključenja i iskustvo neurologa.



Razni vanjski utjecaji mogu dovesti do promjene intrakranijalnog tlaka i neuropsihijatrijskih promjena koje uključuju i demenciju. Traumatske ozljede mozga kod sportaša i ratnih veterana dovode do ozljede aksona (77, 78). Difuzna ili žarišna ozljeda mozga povezana je s progresivnim neurološkim propadanjem i karakterizirana specifičnim patofiziološkim promjenama (79). Subduralni hematoma je također jedan od vanjskih uzroka koji mogu dovesti do demencije (80). Primarni ili metastatski karcinomi u predjelu mozga povezani su s kliničkom slikom demencije (81, 82). Jedna od značajki tzv. Hakimovog trijasa kod normotenzivnog hidrocefalusa, uz inkontinenciju i ataksiju je upravo demencija (83). Paraneoplastički sindromi, apsces i ciste u predjelu mozga mogu se manifestirati simptomima demencije (84, 85, 86). Neke kronične infekcije središnjeg živčanog sustava, poput kroničnog infektivnog meningitisa ili uznapredovale faze infekcije HIV-om su povezane s demencijom (6). Osim toga demencija se može razviti nakon emocionalno stresnog događaja (psihogena amnezija) ili uslijed depresije (pseudodemencija). Metabolički uzroci demencije mogu biti sljedeći: trovanja (alkoholizam, trovanje teškim metalima, kronična upotreba lijekova), hipovitaminoze (vitamini B skupine), zatajenja vitalnih organa, endokrinološki poremećaji i poremećaji ravnoteže elektrolita.

Razlike u demografskim podacima između skupina u našem istraživanju očekivane su obzirom na poznate čimbenike rizika vezane uz pojedine vrste demencija. Bolesnici s dijagnozom VAD su imali najniži BMI, uz istodobno najviši medijan dobi (78 godina). Povišeni indeks tjelesne mase tijekom srednje životne dobi povezan je s rizikom za razvoj AD. Kod bolesnika s dijagnosticiranom demencijom, značajno kognitivno propadanje prati pad BMI. Niske vrijednosti BMI u starijoj dobi mogu se smatrati predkliničkim biljegom demencije (24, 87).

Nalaz značajne razlike u razini obrazovanja između skupina pacijenata s dijagnozom demencije i kognitivno zdravih ispitanika u skladu je s rezultatima dosadašnjih istraživanja. Longitudinalna istraživanja su pokazala da je niža razina obrazovanja povezana s većim rizikom za razvoj AD (24). Kohortno istraživanje pod nazivom „Rotterdam study“ je pratilo zdravu populaciju od 12561 ispitanika longitudinalno i evidentiralo pojavu tranzitorne ishemijske atake, moždanog udara i demencije. Osobe s većom razinom obrazovanja su imale manji rizik za razvoj demencije nakon tranzitorne ishemijske atake i moždanog udara, pretpostavlja se zbog veće kognitivne rezerve (88). Kod provođenja neuropsiholoških testova za procjenu kognitivnih sposobnosti, evidentira se broj godina obrazovanja ispitanika da bi se mogli usporediti rezultati bolesnika. Kod neuropsiholoških testova koja su provedena u našem istraživanju dodan je broj

bodova osobi koja ima manji broj godina obrazovanja da bi se mogli usporediti rezultati osoba s različitim razinama obrazovanja (28).

Udio ispitanika s dijagnozom hipertenzije značajno se razlikovao između ispitivanih skupina, a očekivano je skupina oboljelih od VAD imala najveći udio onih s hipertenzijom. Značajni čimbenik rizika za razvoj cerebrovaskularne bolesti je hipertenzija. Rezultati istraživanja „Rotterdam study“ pokazali su da je uzimanje antihipertenzivnih lijekova smanjilo rizik za razvoj VAD. Hipertenzija i srčano oboljenje povećavaju rizik za razvoj VAD za tri puta (21). Praćenje stupnja kognitivnog propadanja u populaciji bolesnika s hipertenzijom kroz period od 10 godina pokazalo je da su bolesnici koji nisu uzimali antihipertenzive imali izraženije znakove kognitivnog propadanja i brži pad kognitivnih sposobnosti (89).

Analiza demografskih podataka uključivala je podatak o terapiji statinima u ispitivanim skupinama. Statini imaju pozitivan učinak na kognitivnu sposobnost zbog protuupalnog djelovanja i zaštitnog djelovanja na endotel krvnih žila utjecajem na sustav NO-sintaze. Meta-analiza povezanosti AD i ne-genetskih čimbenika rizika utvrdila je da terapija estrogenima, antihipertenzivima, ne-steroidnim protuupalnim lijekovima i statinima ima zaštitno djelovanje koje sprječava razvoj AD (90).

Uz hipertenziju, demografski podatak koji se odnosi na udio zabilježenih dijagnoza fibrilacije atriya u ispitivanim populacijama, pokazao je značajnu razliku i najveći udio takvih bolesnika u skupini s dijagnozom VAD. Svi čimbenici rizika koji su povezani s razvojem cerebrovaskularne bolesti očekivano su zastupljeni u skupini bolesnika s VAD. Zbog nađene razlike u udjelu ispitanika s dijagnozom fibrilacije atriya, utvrđena je i razlika u udjelima ispitanika na antikoagulantnoj terapiji. Walters i suradnici su predložili čimbenike rizika koji imaju potencijal za procjenu petogodišnjeg rizika za razvoj demencije. Podatke o čimbenicima rizika formirali su temeljem povijesti bolesti za kohortu od 930395 bolesnika iz primarne zdravstvene zaštite, u dobi od 60-95 godina. Autori su predložili procjenu petogodišnjeg rizika za razvoj demencije korištenjem već poznatih varijabli iz povijesti bolesti bolesnika poput dobi, spola, socijalne izoliranosti, pušenja, BMI, kroničnog konzumiranja alkohola, terapije antihipertenzivima, šećerne bolesti, moždanog udara/tranzitorne ishemijske atake, fibrilacije atriya, terapije aspirinom i depresije (91).

U našem istraživanju je najveći broj pušača i bivših pušača nađen u skupinama ispitanika s dijagnozama MCI i VAD. Lafortune i sur. su pretražili literaturu objavljenu u periodu od 2000.

do 2014. ispitujući povezanost čimbenika rizika tijekom srednje dobi s ishodima u kasnijoj dobi. Istraživanja su trebala zadovoljiti kriterij minimalnog petogodišnjeg praćenja ispitanika. Podaci temeljeni na dokazima kliničkih istraživanja ukazuju na povezanost pušenja tijekom srednje dobi i izraženog kognitivnog propadanja u kasnijoj dobi. Intenzitet oštećenja i zahvaćenost raznih kognitivnih područja (pamćenje, verbalne sposobnosti, razumijevanje) su ovisili o tome koliko dugo je ispitanik bivši pušač i ukoliko je pušač, o dnevnoj količini cigareta (92).

Šećerna bolest je komorbiditet koji se smatra čimbenikom rizika za AD i VAD. Naše istraživanje nije utvrdilo značajnu razliku u udjelu oboljelih od šećerne bolesti između skupina. U populaciji starijoj od 60 godina očekivano je da će skupina kognitivno zdravih ispitanika i MCI skupina sadržavati oboljele od šećerne bolesti. Istovremena prisutnost šećerne bolesti i drugih negenetskih i genetskih čimbenika rizika dugoročno djeluje na razvoj neurodegenerativnog procesa ili vaskularnih promjena u tkivu mozga.

U sklopu ispitivanja djelovanja na etiološke čimbenike, provedeno je randomizirano kontrolirano istraživanje FINGER (engl. Finnish Geriatric Intervention Study to Prevent Cognitive Impairment and Disability) (25). Dvogodišnje intervencije provedene su u području prehrane, fizičke aktivnosti, socijalnih aktivnosti i poboljšanja kognitivnih sposobnosti, te upravljanja vaskularnim čimbenicima rizika. Rezultati istraživanja su pokazali da intervencije u više područja mogu poboljšati ili održavati kognitivne sposobnosti starije populacije na istoj razini.

Alzheimerova bolest se dijagnosticira kada se kod pogođenog pojedinca detektiraju znakovi kognitivnog propadanja. Takvi simptomi su praćeni s disfunkcijom sinapsi i atrofijom moždanih struktura, u prvom redu hipokampusa i sljepoočnog režnja. Klinička istraživanja usmjerena su na dijagnosticiranje početnih faza AD, tzv. faze I i II kod kojih se na području transentorinalnog korteksa deponiraju agregati **Aβ** i **tau** proteina, ali takve promjene još nisu manifestirane karakterističnim simptomima (9). Niz istraživanja usmjeren je na biokemijske biljege u krvi koji bi omogućili ranu dijagnostiku demencije.

Imunohistokemijskom analizom moždanog tkiva preminulih bolesnika koji nisu imali promjene karakteristične za AD i koji su poslužili kao kontrole i obduciranih bolesnika s dijagnozama AD i Parkinsonove bolesti nađene su molekule **KLK6** u senilnim plakovima i neurofibrilarnim čvorovima.

Korištenjem tehnika reverzne transkriptaze - lančane reakcije polimerazom i histokemijskom *in situ* hibridizacijom ispitana je ekspresija mRNA za **KLK6**, pri čemu su relativne razine **KLK6** u mozgu oboljelih od AD bile niže od razina izmjerenih kod kontrola (93). Pretpostavljeno je da **KLK6** nastaje sekrecijom iz neurona i da ima ulogu u razgradnji patoloških agregata. Zbog toga su se tijekom godina intenzivirala istraživanja na toj molekuli koja pripada porodici serinskih proteaza.

Diamandis i njegovi suradnici proveli su niz istraživanja vezanih uz strukturu i kompleksne uloge koje imaju molekule koje pripadaju porodici kalikreina. Za **KLK6** je, osim utvrđenog amiloidogenog potencijala, nađena i smanjena ekspresija u stanicama metastatskog karcinoma dojke (94). Razvoj imunofluorometrijskog testa omogućio je detekciju **KLK6** u raznim tjelesnim tekućinama. Određivanjem koncentracije serumskog **KLK6** u kontrolnoj skupini i skupini ispitanika s raznim vrstama karcinoma, Diamandis i suradnici su utvrdili da je koncentracija **KLK6** značajno povećana u skupini bolesnika s dijagnozom karcinoma jajnika (95).

Darling i sur. otkrili su da je ekspresija **KLK6** znatno niža kod nekoliko vrsta tumora žlijezda slinovnica, u odnosu na njegovu ekspresiju u normalnom tkivu žlijezde slinovnice, što ga čini pogodnim biljekom tumora žlijezda slinovnica (96).

Skupina japanskih znanstvenika istražila je *post mortem* imunohistokemijski moždano tkivo AD bolesnika i zdravih pojedinaca. U moždanom tkivu zdravih ispitanika **KLK6** je detektiran u glija stanicama, dok je kod bolesnika s AD nađen u senilnim plakovima i neurofibrilarnim čvorovima. Osim toga, odredili su koncentraciju **KLK6** u likvoru bolesnika s dijagnozom periferne neuropatije i dijagnozom AD i utvrdili da se u likvoru nalazi u inaktivnom obliku proenzima. Nisu utvrdili značajnu razliku u koncentracijama **KLK6** između ispitivanih skupina, ali su našli pozitivnu povezanost koncentracije **KLK6** s dobi u skupini bolesnika s perifernom neuropatijom, dok u skupini bolesnika s AD nisu našli takvu povezanost. Zbog toga su pretpostavili da bi niske koncentracije **KLK6** mogle biti povezane s povećanim rizikom za razvoj AD (46). Navedeno istraživanje u likvoru provedeno je na bolesnicima čija se prosječna dob u skupinama razlikovala: u skupini bolesnika s perifernom neuropatijom prosječna dob muškaraca je bila 45, a žena 41 godina, dok je u skupini bolesnika s AD prosječna dob muškaraca bila 72, a žena 77 godina. U našem istraživanju smo usporedili koncentracije **KLK6** između sličnih dobnih skupina.

Yousef i sur. su određivali *post mortem* koncentraciju **KLK6** u ekstraktima moždanog tkiva oboljelih od AD i ekstraktima normalnog moždanog tkiva i utvrdili su da je koncentracija **KLK6** dvostruko niža u skupini s AD. Imunohistokemijskom tehnikom su našli ekspresiju **KLK6** u epitelnim stanicama koroidnog pleksusa. Određivanjem koncentracije **KLK6** u likvoru u skupini ispitanika s dijagnozom AD i kontrolnoj skupini otkrivene su trostruko veće koncentracije u AD skupini. Također, uzorci pune krvi bolesnika s AD su imali veće koncentracije **KLK6** od kontrolnih uzoraka. Autori su također ispitivali sadržaj **KLK6** u pojedinim regijama mozga i našli su manju količinu u hipokampusu i korteksu u odnosu na ekstrakte kontrolnih ispitanika (97). Razlika u matriksu (puna krv nasuprot serumu), tehnici određivanja i dizajnu samog istraživanja je mogući uzrok neslaganja u rezultatima našeg istraživanja s rezultatima koje je dobila navedena skupina istraživača.

Menendez-Gonzalez i suradnici određivali su koncentraciju **KLK6** u plazmi bolesnika s MCI i kontrolnih ispitanika. Svi ispitanici uključeni u istraživanje bili su stariji od 60 godina. Bolesnici s dijagnozom MCI uključeni su prema Petersenovim kriterijima, a kriteriji isključenja su bili dijagnoza AD i VAD, te demencije uzrokovane hidrocefalusom, tumorom, trovanjem ili zatajenjem vitalnih organa. Osobe bez poremećaja rada središnjeg živčanog sustava bile su uključene u skupinu kontrolnih ispitanika. Bolesnicima je napravljena slikovna i neuropsihološka obrada. Tijekom perioda od 18 mjeseci ispitanicima se provodila procjena stanja u šestomjesečnim intervalima. Koncentracija **KLK6** se određivala kod svih ispitanika ELISA metodom na početku istraživanja i nakon 18 mjeseci. Na početku istraživanja, uključeno je 66 bolesnika s dijagnozom MCI. Nakon 18 mjeseci, 30 bolesnika nije pokazalo znakove kognitivnog propadanja karakteristične za jasnu demenciju, dok je kod 23 bolesnika dijagnosticirana AD i kod 13 je došlo do konverzije u VAD. AD je dijagnosticirana prema kriterijima NINCDS-ADRDA, a VAD prema kriterijima NINCDS-AIREN. Nije nađena značajna razlika u koncentraciji **KLK6** između kontrolne i MCI skupine. Praćenje koncentracija **KLK6** u MCI skupini pokazalo je da postoje značajne razlike u koncentracijama **KLK6** između bolesnika kojima je MCI progredirao u AD i onih kojima je došlo do prelaska u VAD. Povećanje koncentracije **KLK6** je bilo značajno za bolesnike kojima se MCI razvio u VAD (od 7,17 ng/mL na početku istraživanja do 8,79 ng/mL nakon 18 mjeseci), dok pad koncentracije **KLK6** kod konverzije MCI u AD nije bio značajan (od 4,96 ng/mL kod početnog mjerenja na 4,87 ng/mL nakon 18 mjeseci). Prema dobivenim koncentracijama **KLK6** na početku istraživanja, bolesnike su podijelili u skupine s niskom, odnosno visokom koncentracijom **KLK6**. Utvrdili su da je „cut off“ koncentracija 5,25 ng/mL i prema njoj

odredili relativni rizik za razvoj AD, odnosno VAD iz MCI (47). Kao i kod našeg istraživanja, autori nisu utvrdili značajnu razliku u koncentracijama **KLK6** između kontrolne i MCI skupine. Zbog razlike u koncentraciji između skupine oboljelih od MCI i onih bolesnika kod kojih je došlo do konverzije u MCI, autori su predložili uzastopna određivanja **KLK6** za utvrđivanje progresije MCI. U ovom istraživanju autori nisu koristili neuropsihološke testove za procjenu kognitivne sposobnosti u kontrolnoj skupini ispitanika, nego im je kriterij za uključene bio određen izostankom bilo kakve dijagnoze vezane uz središnji živčani sustav. Populacija osoba starijih od 60 godina može pokazivati određene znakove kognitivnog deficita, zbog čega je potrebno provesti neuropsihološko testiranje u toj skupini ispitanika i na taj način definirati homogenu skupinu kognitivno zdravih ispitanika.

U drugom istraživanju Menendez-Gonzaleza i suradnika autori su usporedili koncentracije **KLK6** u plazmi u skupini kontrolnih ispitanika sa skupinom bolesnika koji su imali kognitivni poremećaj. Kontrolna skupina se sastojala od 228 ispitanika koji nisu bili iste dobi kao ispitanici iz skupine s kognitivnom disfunkcijom. Jedan dio kontrolne skupine su bili supružnici oboljelih od nekog oblika kognitivne disfunkcije i bili su većinom stariji od 60 godina, međutim drugi dio su bili dobrovoljni davatelji krvi. Statističkom analizom nađena je značajna razlika u dobi između kontrolne skupine i skupine bolesnika s kognitivnim deficitom. U skupini od 447 bolesnika s kognitivnom disfunkcijom bili su bolesnici s dijagnozom AD, VAD, MCI, demencije s Lewyevim tjelešcima ili Parkinsonove demencije, frontotemporalne demencije, Huntingtonove bolesti, primarne progresivne afazije, kortikobazalne degeneracije, Creutzfeldt-Jakobsove bolesti i pseudodemencije. Broj bolesnika s određenom dijagnozom se razlikovao, od najvećeg broja (N = 199) s dijagnozom AD, 68 bolesnika s MCI, 52 s VAD, 18 s pseudodemencijom do samo jednog s Huntingtonovom bolesti. Kod svih bolesnika je provedena procjena pomoću neuropsiholoških testova i slikovnih tehnika, a dodatno je u skupini oboljelih od AD napravljena genotipizacija ApoE. Koncentracija **KLK6** određena je ELISA metodom. U skupini kontrolnih ispitanika utvrđena je pozitivna korelacija dobi i koncentracije **KLK6**. U skupini bolesnika s dijagnozom AD utvrđeno je 43,2% nositelja barem jednog Apo E4 alela. Koncentracije **KLK6** između bolesnika s AD koji su nositelji ApoE4 alela i onih koji nisu nositelji nisu se značajno razlikovale. Značajna razlika u koncentraciji plazmatskog **KLK6** nađena je između skupine oboljelih od AD u odnosu na skupinu s VAD i skupinu s pseudodemencijom, sa značajno nižom koncentracijom u skupini s AD u odnosu na VAD i pseudodemenciju (48). Razlike u rezultatima našeg i navedenog istraživanja proizlaze iz odabira kontrolnih ispitanika, definiranja kriterija uključenja i matriksa u kojem su provedene

analize (plazme). Naime, autori su u formiranju kontrolne skupine koristili uzorke osoba u širokom rasponu dobi iz Centra za transfuziju, što su i naveli kao ograničenje istraživanja. U skupinu bolesnika s dijagnozom AD uključeni su bolesnici sa stadijem 4 do 6 GDS-a (engl. Global Deteriation Scale) koji obuhvaća ranu (4), umjerenu (5) i umjereno jaku (6) demenciju. Autori su pretpostavili da bi **KLK6** mogao biti koristan biljeg za razlikovanje kontrola, tj. kognitivno zdravih i AD u starijoj dobi, obzirom na nađenu pozitivnu korelaciju koncentracije **KLK6** i dobi i rezultate istraživanja na moždanim tkivima, likvoru i plazmi koji povezuju dijagnozu AD s nižom razinom **KLK6**. Autori su ispitali mogućnost pogrešne interpretacije rezultata istraživanja zbog dobi i spola ispitanika u skupinama. Nije nađena značajna razlika između skupine s dijagnozom AD i kontrolne skupine obzirom na spol. Međutim, mogućnost sustavne pogreške kod ovog istraživanja postoji obzirom na značajnu razliku u prosječnoj dobi kontrolnih ispitanika i ispitanika s AD. Uvjeti pohrane uzoraka plazme, te specifičnost matriksa kod analize i sama metoda određivanja **KLK6** također bi mogle imati značajan utjecaj na razlike u dobivenim rezultatima istraživanja. Autori nisu naveli podatke o uzrokovanju i uvjetima pohrane plazme.

U kulturi stanica kojima su dodani **KLK6** i cDNA APP-a putem kotransfekcije nađen je **A $\beta$** . Osim uloge u nakupljanju **A $\beta$**  u AD, **KLK6** također razgrađuje  $\alpha$  sinuklein, protein sinapse, čiji se dijelovi nakupljaju u obliku netopljivih čestica. Nakupljanje  $\alpha$  sinukleina je patofiziološka značajka Parkinsonove bolesti (98).

Tatebe i suradnici su utvrdili da je **KLK6** unutar stanice lokaliziran unutar endoplazmatskog retikuluma i da ima sposobnost razgradnje  $\alpha$  sinukleina *in vitro*, s tim da samo vanstanični **KLK6** ima proteaznu aktivnost, a unutarstanični ne (99). Autori su kotransfekcijom unijeli **KLK6** i  $\alpha$  sinuklein u stanice i utvrdili da **KLK6** ne razgrađuje  $\alpha$  sinuklein unutar stanice, nego da ima sposobnost razgradnje vanstaničnog  $\alpha$  sinukleina.

Scarisbrick i suradnici su istraživali ulogu **KLK6** u preživljavanju limfocita u eksperimentalnim animalnim modelima i našli da stimulira sintezu proteina uključenih u preživljavanje, a inhibira pro-apoptoski protein. Djelovanje **KLK6** je dijelom ovisno o aktiviranju PAR1. U serumu pacijenata oboljelih od multiple skleroze nađene su povećane koncentracije **KLK6** (100).

Martinez-Morillo i suradnici su odredili referentne intervale i biološku varijaciju za **KLK6** u serumu. Koncentraciju **KLK6** su određivali pomoću ELISA metode. Za određivanje

referentnih intervala autori su koristili uzorke seruma od 136 zdravih dobrovoljaca prema preporukama CLSI (engl. Clinical and Laboratory Standards Institute). U podskupini od 42 zdrava dobrovoljca su dodatno proveli uzrokovanje u epruvetu s heparinom radi usporedbe rezultata **KLK6** dobivenih u uzorku seruma i heparinizirane plazme. Također, kod četiri zdrava dobrovoljca (dvije žene i dva muškarca s rasponom dobi od 30 do 38 godina) su proveli ispitivanje biološke varijabilnosti **KLK6**. Uzorkovanja su provedena dva puta tjedno tijekom 2 mjeseca. Kod analize podataka dobivenih za ispitivanje referentnih intervala, autori nisu našli značajnu povezanost koncentracije **KLK6** sa spolom i dobi. Zbog toga su na znatno većoj populaciji od 1043 ispitanika koji su dolazili na rutinski sistematski pregled ispitali povezanost koncentracije **KLK6** s dobi i spolom. Utvrdili su da postoji značajna pozitivna slaba korelacija (Spearmanov koeficijent = 0,205,  $P < 0,0001$ ) između **KLK6** i dobi ispitanika. Što se tiče spola, nije nađena razlika u koncentraciji **KLK6**. Vrijednosti intra- (11,8%) i interindividualne (27,6%) biološke varijabilnosti ( $CV_I$  i  $CV_G$ ) izračunate su prema metodi Frasera i suradnika. Iz dobivenih vrijednosti  $CV_I$  i  $CV_G$  izračunati su indeks individualnosti (0,43) i klinički značajna promjena (35%). Osim toga, kod 106 bolesnika s dijagnozom bubrežnog zatajenja izmjerena je koncentracija kreatinina i **KLK6**. U populaciji bolesnika sa zatajenjem bubrega našli su pozitivnu korelaciju s koncentracijom kreatinina, dok za ovu skupinu bolesnika nije nađena pozitivna povezanost između koncentracije **KLK6** i dobi. Kod usporedbe matriksa plazme i seruma autori su naveli da nije nađena statistički značajna razlika, međutim, za statističku analizu usporedivosti koncentracija **KLK6** u različitim vrstama uzoraka veću snagu imaju regresijske analize kojima se detektira prisutnost proporcionalne, odnosno konstantne pogreške (49).

**CLU** je, kao pratiteljska molekula, uključen u proces stvaranja neuritičkih plakova. Molekula **CLU** se veže za toksične **A $\beta$**  peptide i prenosi ih kroz krvno-moždanu barijeru. Sudjeluje u uklanjanju nakupljenih agregata **A $\beta$** . Istraživanja su pokazala da djelovanje **CLU** povećava topljivost **A $\beta$** . Način djelovanja **CLU** povezan je s količinom peptida **A $\beta$** . **A $\beta$**  nije jedina molekula za koju se veže **CLU**, jer je njegova prisutnost nađena i kod drugih bolesti kod kojih dolazi do nakupljanja proteina. Vezanje **CLU** za proteine izložene stresu sprječava njihovo nakupljanje i istovremeno blokira imunosni odgovor na proteine sklone agregiranju. Na taj način se neuroni štite od djelovanja proupalnih citokina nastalih imunosnom reakcijom. **CLU** se veže i za C5b-7 komponentu komplementa, čime dodatno sprječava upalnu reakciju. Postoje dokazi da **CLU** interakcijom s TGF $\beta$  djeluje neuroprotektivno (50,52). **CLU** služi kao



svojevrsan biljeg razine oksidativnog stresa u stanicama. Unutarstanični oblik **CLU**, nuklearni **CLU** uključen je u apoptotske procese u stanici (101).

Mukaetova-Ladinska i suradnici su odredili koncentraciju plazmatskog i trombocitnog **CLU** u uzorcima bolesnika s dijagnozom AD i kontrolnih ispitanika. Istraživanje je provedeno na skupini od 25 bolesnika s AD koji je dijagnosticiran prema NINCDS-ADRDA kriterijima. Grupa zdravih ispitanika se sastojala od 26 osoba koje nisu imale kognitivne ili neurološke probleme. U ovom istraživanju i kontrolni ispitanici i bolesnici s AD su bili podvrgnuti rutinskoj neurološkoj obradi koja je uključivala i neuropsihološke testove. Osim MMSE, autori su koristili i neuropsihijatrijske testove da ispituju stupanj depresije i ne-kognitivna obilježja AD. Neposredno nakon uzorkovanja provedena je izolacija trombocita i pripremljena je plazma bez albumina za određivanje koncentracije **CLU** pomoću ELISA metode (56). Kao i kod našeg istraživanja, nisu zabilježili statistički značajne razlike u koncentraciji **CLU**. Autori su ispitivali postojanje razlike na skupinama koje su imale znatno manji broj ispitanika. Neki elementi neuropsihijatrijskih testova, poput agresije, apatije i iritabilnosti su pokazivali razliku kod dobivenih vrijednosti omjera **CLU** u plazmi i trombocitima, što autori povezuju s istraživanjima koja su dokazala veću frekvenciju neuropsihijatrijskih problema kod bolesnika koji su homozigoti za ApoE4. Razlike u dobivenim rezultatima istraživanja provedenim u uzorcima plazme, seruma ili na trombocitima mogu se tumačiti i postojanjem varijante gena za **CLU** koja je rizična za razvoj AD, a koja može biti prisutna u populaciji zdravih ispitanika i bolesnika s AD. Terapija antiepilepticima i estrogen povećavaju ekspresiju **CLU** i tako utječu na varijabilnost dobivenih rezultata istraživanja. Na povećanje koncentracije **CLU** utječu i depresija, metastatski karcinomi, šećerna bolest i koronarna srčana bolest.

Thambisetty i suradnici su odredili koncentraciju **CLU** u uzorcima plazme pacijenata s AD, kod pacijenata s MCI i kontrolnih ispitanika. Korišteni su uzorci iz dva istraživanja – kohorta Alzheimer's Research Trust provedena u Kings College-u u Londonu (KCL-ART) i AddNeuroMed. KCL-ART je obuhvaćala populaciju zdravih ispitanika starije dobi, te AD i MCI skupinu čije se stanje pratilo jednom godišnje od 2001. godine. Istraživanje AddNeuroMed obuhvaćalo je 6 europskih centara u kojima se populacija bolesnika s AD procjenjivala u tromjesečnim intervalima tijekom prve godine istraživanja, a nakon toga jednom godišnje, poput kontrolne skupina i skupine s dijagnozom MCI. Svim ispitanicima su provedeni standardizirani neuropsihološki testovi, koji uključuju MMSE. Dijagnoza AD je postavljena prema kriterijima NINCDS-ADRDA. Kognitivno zdravi stariji ispitanici su

odabrani za kontrolnu skupinu ako su na MMSE testu imali više od 28 bodova. Autori su analizirali rezultate mjerenja za 95, odnosno 689 ispitanika, uz rezultate dobivene provođenjem Baltimore Longitudinal Study of Aging na 60 ispitanika. U istraživanju su se koristile nove slikovne tehnike (MRI, PET), te proteomska i genomska analiza. Problem s oblikovanjem istraživanja vezanih uz identifikaciju biokemijskih biljega leži u skupinama ispitanika: kontrolni ispitanici iste dobi mogu već imati amiloidne plakove, a da ne pokazuju jasne znakove kognitivnog propadanja i isto tako sama skupina bolesnika s dijagnozom AD može biti vrlo raznolika obzirom na intenzitet simptoma i primijenjenu terapiju. Zbog toga su se autori odlučili za primjenu proteomske analize u svim skupinama. Proteomska analiza je korištena u početnoj fazi za odabir proteina-kandidata za sljedeću, validacijsku fazu istraživanja.

Najpogodniji protein koji je bio detektiran u svim proteomskim analizama je bio **CLU**. U validacijskoj fazi su određene koncentracije **CLU** u plazmi pomoću ELISA metode pri čemu je korišten reagens istog proizvođača (Biovendor) koji smo koristili u našem istraživanju. Koncentracije **CLU** nisu se značajno razlikovale između skupina, kao i kod našeg istraživanja. Autori su ispitali i da li postoji razlika u koncentraciji **CLU** obzirom na to jesu li ispitanici nositelji alela ApoE4 i nisu utvrdili statistički značajnu razliku. Praćenjem pokazatelja kognitivne sposobnosti pomoću MMSE testa i istodobnim određivanjem koncentracije **CLU** u plazmi, autori su utvrdili da brži pad kognitivnih sposobnosti prati brže povećanje koncentracije **CLU**. Osim toga, povećane koncentracije **CLU** kod kognitivno zdravih osoba ukazuju na veći obim amiloidnih fibrila u području entorinalnog korteksa, nađenih korištenjem PET uređaja. Obzirom na dobivene rezultate, autori su ispitali hipotezu da bi **CLU** mogao biti biljeg demencije kod kognitivno zdravih starijih osoba. Zbog toga su proveli određivanje **CLU** kod populacije bolesnika uključenih u Baltimore Longitudinal Study of Aging. Koncentracije **CLU** su izmjerene u uzorcima plazme koji su bili pohranjeni 10 godina prije istraživanja koja su koristila PET tehniku. Na taj način su autori htjeli ispitati povezanost koncentracije **CLU** s promjenama u deponiranju amiloida koje su slijedile. Utvrdili su da su veće koncentracije **CLU** kod osoba koje su bile kognitivno zdrave bile povezane s većim stupnjem deponiranja amiloida karakterističnim za AD i MCI.

U uzorcima ispitanika iz kontrolne, MCI i AD skupine izmjerena je razina mRNA za **CLU** i utvrđeno je da je gen za **CLU** bio značajno više eksprimiran u AD skupini u odnosu na MCI i kontrolnu skupinu. Razina mRNA za **CLU** nije bila povezana s koncentracijom **CLU** u plazmi,

ApoE4 alelom i rezultatima MMSE testova. GWAS istraživanja su ukazala na postojanje 7 SNP koji su povezani rizikom za razvoj AD, međutim u ovom istraživanju nije nađena povezanost tih polimorfizama s mRNA za **CLU**, niti s koncentracijom **CLU** u plazmi. Pretpostavka je da povećane koncentracije **CLU** u plazmi potječu iz jetrenog ili čak moždanog **CLU**, a ne iz krvnih stanica. Posttranslacijske modifikacije **CLU** bi mogle, uz samu povišenu koncentraciju, igrati ulogu u napredovanju kognitivnog propadanja.

Autori su također proveli istraživanje na transgeničnim miševima kojima se povećano stvaraju amiloidni plakovi i utvrdili da imaju značajno veću koncentraciju **CLU** u plazmi u odnosu na kontrolne miševe koji nisu imali amiloidne plakove. Imunohistokemijskom analizom moždanog tkiva transgeničnih miševa nađeno je istovremeno nakupljanje i **Aβ** i **CLU** u plakovima.

Temeljem ovog složenog istraživanja autori su zaključili da visoka koncentracija **CLU** kod bolesnika s dijagnozom AD povezana s ubrzanim kognitivnim propadanjem. Kod zdravih osoba je visoka koncentracija **CLU** povezana sa stvaranjem nakupina amiloida u području entorinalnog korteksa. Uz dokazanu korisnost **CLU**, naglašena je i potreba za intenzivnijim istraživanjima drugih proteina povezanih s formiranjem amiloidnih plakova, poput  $\alpha$ 2-makroglobulina.

Bez obzira na činjenicu da **CLU** nema diskriminacijsku moć, on omogućava procjenu intenziteta kognitivnog propadanja kod bolesnika s AD i povezan je s nastankom amiloidnih plakova prije pojave simptoma (102).

Ista skupina autora je u drugom istraživanju određivala koncentraciju **CLU** u plazmi u MCI i kontrolnoj skupini i ispitala je povezanost s longitudinalnim promjenama u volumenu mozga koje se procjenjuju pomoću MRI. Neurološko slikovno istraživanje provedeno je na 139 osoba kod kojih nije utvrđen kognitivni deficit na početku istraživanja. Kriteriji isključenja kod definiranja ove skupine bili su dijagnoza moždanog udara, karcinoma s metastazama ili teškog oboljenja pluća ili srca. Kod izvođenja inicijalnog MRI provedeno je uzorkovanje za **CLU**. Uzorci plazme su se nakon uzrokovanja i centrifugiranja pohranili na -80°C. Određivanje koncentracije **CLU** u plazmi provedeno je ELISA metodom s istim reagensom koji je korišten i za potrebe našeg istraživanja. Autori su proveli i istraživanje na *post-mortem* moždanom tkivu

osoba s dijagnozom AD i zdravih osoba. Kod osoba kojima je bila dijagnosticirana AD prema NINCDS-ADRDA kriterijima za života, definitivna dijagnoza je potvrđena analizom moždanog tkiva. Za života zdravih i AD ispitanika jednom godišnje su napravljeni MRI mozga i neuropsihološki testovi. Od ukupnog broja ispitanika, kod 16 se razvio MCI koji je dijagnosticiran prema Petersenovim kriterijima, a kod 7 ispitanika iz te MCI skupine se razvila demencija.

Obradom demografskih podataka autori su utvrdili da su ispitanici s dijagnozom MCI imali manje bodova kod MMSE testa i bili su stariji u odnosu na kognitivno zdrave ispitanike. Rezultat istraživanja je, što se tiče ispitivanja razlike u koncentracijama **CLU** između skupine s MCI i kognitivno zdrave skupine bio isti kao kod našeg istraživanja – nije nađena statistički značajna razlika.

Nalazi MRI dobiveni longitudinalnim praćenjem pokazali su značajne i progresivne promjene u svim regijama mozga kod MCI skupine u odnosu na skupinu kognitivno zdravih ispitanika. Usporedbom podataka o koncentraciji **CLU** s nalazima MRI, autori su primijetili da je u skupini bolesnika s dijagnozom MCI veća koncentracija **CLU** bila povezana s sporijim procesom atrofije mozga.

Ovakav nalaz autori tumače ulogom **CLU** u procesu eliminacije **A $\beta$**  i moduliranja upalnog odgovora kod oboljelih od MCI. **CLU** ima neuroprotektivni učinak koji je kod populacije bolesnika s AD dokazan post-mortem analizom, gdje je nađeno njegovo povećano nakupljanje u dijelovima mozga koji su posebno osjetljivi na deponiranje amiloidnih plakova. Suprotno povezanosti visoke koncentracije **CLU** u plazmi i sporijeg procesa atrofije kod MCI, visoka koncentracija **CLU** u plazmi je povezana s ubrzanim procesom atrofije kod AD. Pretpostavka je da kod AD dolazi do zakazivanja neuroprotektivnog učinka **CLU** i samim time, do značajnog napredovanja kognitivnog propadanja.

Autori su također ispitali da li koncentracija **CLU** u plazmi odražava koncentraciju **CLU** u moždanom tkivu. Povezanost koncentracije **CLU** u plazmi i koncentracije **CLU** u mozgu našli su samo kod uzoraka moždanog tkiva dobivenog autopsijom s područja gornjeg sljepoočnog girusa. To područje je posebno pogođeno kod AD i takav nalaz bi se mogao povezati s ulogom **CLU** u nastanku AD, međutim, nije jasno jesu li visoke koncentracije posljedica ranih promjena

u mozgu ili su odraz sistemske reakcije na oksidativno oštećenje (103). Vanstanični proteini pratitelji koji bi mogli utjecati na nakupljanje **A $\beta$**  su, osim **CLU**,  $\alpha$ -2-makroglobulin (A2M), haptoglobin i serumski amiloid P (SAP). Istraživanja temeljena na neuropsihološkoj procjeni, slikovnim tehnikama i određivanju koncentracije A2M i SAP u plazmi otkrila su povezanost sa stupnjem atrofije mozga, odnosno kognitivnog propadanja. Istraživanja su ukazala na negativnu povezanost koncentracije haptoglobina u plazmi s rezultatima kognitivnih testova.

Rezultati dosadašnjih istraživanja upućuju na važnu ulogu proteina pratitelja, u prvom redu **CLU**, u nastanku i razvoju AD. Buduća istraživanja bi trebala razjasniti je li uzrok povećane koncentracije proteina pratitelja (**CLU**, A2M, SAP) u plazmi reakcija na povećano nakupljanje **A $\beta$**  u mozgu ili je to dio sustavnog odgovora na stres. Također bi trebala definirati podrijetlo povećanih koncentracija proteina pratitelja u plazmi, tj. radi li se o proteinima pratiteljima iz mozga koji su na neki način prešli krvno-moždanu barijeru ili su iz periferije. Svi proteini pratitelji su također podvrgnuti procesu posttranslacijske modifikacije, tj. glikozilacije i pitanje je kako i u kojoj mjeri to utječe na proces nastajanja i napredovanja AD. Paralelno s definiranjem uloge proteina pratitelja u ranoj dijagnostici AD, otvaraju se mogućnosti za korištenje tih molekula za terapijske intervencije koje će spriječiti ili znatno usporiti AD (104).

U istraživanju utjecaja varijante gena za **CLU** autori su ispitivali dvije komplementarne skupine ispitanika. Prva skupina se sastojala od 88 sudionika kojima nije dijagnosticirana demencija (AD ili MCI). Isključene su osobe s dijagnosticiranim moždanim udarom, teškom ozljedom glave ili infekcijom u središnjem živčanom sustavu. Tijekom prosječno 7,5 godina periodički je provedeno slikovno testiranje pomoću PET tehnike. U toj populaciji kognitivno zdravih osoba ispitivalo se da li je SNP varijanta **CLU** gena povezana s povećanim rizikom za promjene karakteristične za AD.

U drugoj skupini se ispitivao utjecaj rizičnog polimorfizma **CLU** kod kognitivno zdravih osoba koje su nositelji i osoba koje su imale konverziju u MCI ili AD. Kod njih su se provodili neuropsihološki testovi periodički svake 2 godine. Autori su isključili rezultate procjene kod konverzije u MCI i AD i sve rezultate procjene koji su napravljene prije nego što je ispitanik navršio 60 godina starosti. U skupini kognitivno normalnih uključeno je 599 ispitanika, dok je u skupini onih koji su konvertirali u MCI ili AD bilo 95 ispitanika. Kod prve skupine kognitivno zdravih ispitanika uočene su izražene promjene PET tehnikom kod ispitanika s rizičnim

polimorfizmom. Slični rezultati zabilježeni su i kod kognitivno zdravih nositelja ApoE4. U drugom dijelu istraživanja, kod osoba koje su ostale kognitivno zdrave tijekom cijelog perioda i nisu imale konverziju u MCI ili AD nisu dokazane značajne razlike u rezultatima neuropsiholoških testova između nositelja i ne-nositelja rizičnog polimorfizma (105).

Koncentracije **ADPN** u serumu u populaciji bolesnika s vjerojatnom AD i populaciji kontrolnih ispitanika određivane su zajedno s leptinom, lipidnim statusom i ApoE kao dio longitudinalnog kohortnog istraživanja. U istraživanje je bilo uključeno ukupno 347 ispitanika. Skupina s dijagnozom vjerojatne AD sastojala se od 150 ispitanika, a u kontrolnoj skupini bilo je 197 kognitivno zdravih ispitanika. Svakom ispitaniku je proveden rutinski medicinski sistematski pregled, neuropsihološko testiranje i uzorkovanje krvi. Dijagnoza vjerojatne AD postavljena je prema kriterijima NINCDS-ADRDA, a ispitanici su bili u ranoj fazi AD prema rezultatima neuropsiholoških testova. Isključeni su ispitanici za koje je utvrđeno da imaju VAD. Osobe koje su imale ukupni broj bodova u neuropsihološkim testovima unutar referentnog intervala uključene su u kontrolnu skupinu. Svim ispitanicima su kod rutinskog, sistematskog pregleda uzeti podaci o dobi, spolu, broju godina obrazovanja i BMI. U okviru laboratorijske obrade svim ispitanicima je određen lipidni profil, koncentracije leptina i **ADPN** i genotipizacija ApoE.

Analiza prikupljenih demografskih podataka pokazala je da su u skupini s AD bili značajno stariji ispitanici (medijan 80 godina) u odnosu na kontrolnu skupinu (medijan 70 godina). Koncentracija ukupnog i LDL kolesterola je bila značajno viša u AD skupini. Kontrolna skupina je imala veći broj godina obrazovanja, BMI i koncentraciju HDL kolesterola. Logističkom regresijskom analizom dobivenih podataka nađeno je da su u populaciji muškaraca čimbenici koji povećavaju rizik za AD manji broj godina obrazovanja, niža koncentracija HDL kolesterola i najmanje jedan ApoE4 alel. Za žensku populaciju su čimbenici rizika bili starija dob, manji broj godina obrazovanja, niža koncentracija HDL kolesterola i najmanje jedan ApoE4 alel.

Nije nađena značajna razlika u koncentraciji leptina, **ADPN** i triglicerida. Rezultati koji se odnose na koncentraciju **ADPN** su u skladu s našim zapažanjima. Pretpostavka je da test kojim se određuje ukupna koncentracija **ADPN**, a koji je korišten u oba istraživanja, nije tako dobar pokazatelj kao visokomolekularni oblik **ADPN** ili omjer visokomolekularnog i ukupnog **ADPN**. Ograničenje ovog istraživanja je značajna razlika u dobi između ispitanika s AD i kognitivno zdravih ispitanika. Broj godina obrazovanja je bio 2 godine manji u skupini s AD, što bi također moglo predstavljati problem u interpretaciji rezultata istraživanja. Ovo

istraživanje je dio longitudinalnog kohortnog istraživanja i po karakteristikama je presječno istraživanje, pa nije bilo moguće utvrditi da li su leptin i **ADPN** čimbenici rizika za razvoj AD. Nedostatak istraživanja bi moglo biti nestandardizirano vrijeme uzorkovanja, koje se najviše reflektira na koncentraciju leptina. Također se smatra da veću snagu ima određivanje učinaka rezistencije na leptin od samog određivanja koncentracije leptina (106).

Teixeira i suradnici su odredili koncentraciju ukupnog **ADPN** u serumu u skupinama bolesnika s dijagnozom MCI i AD, te kod kognitivno zdravih starijih osoba. Od ukupno 157 ispitanika starije dobi, 41 ispitanik je imao dijagnozu blage do umjerene AD, amnestički MCI je imalo 65 ispitanika, a 51 ispitanik je pripadao kontrolnoj, kognitivno zdravoj skupini. Svi ispitanici su bili podvrgnuti opsežnom pregledu i neuropsihološkim testovima. Oni ispitanici koji su imali dijagnozu amnestičkog MCI i kognitivno zdravi ispitanici su podvrgnuti periodičkim pregledima i testiranjima u intervalima od godine dana, kako bi se ispitala povezanost **ADPN** s konverzijom iz normalnog kognitivnog stanja u MCI i konverzijom iz MCI u AD. Dijagnoza AD je postavljena prema kriterijima NINCDS-ADRDA, a za amnestički MCI korišteni su Petersenovi kriteriji. Uzorkovanje krvi je provedeno u standardiziranim uvjetima, a uzorci seruma su pohranjeni na -80°C. Koncentracija **ADPN** je određena ELISA metodom, za razliku od našeg istraživanja koje je koristilo potpuno automatiziranu, imunoturbidimetrijsku metodu. Kao i u našem istraživanju, autori su koristili reagens koji mjeri sve oblike **ADPN** u cirkulaciji – nisko-, srednje i visokomolekularne, tj. ukupni **ADPN**. Svim ispitanicima napravljena je genotipizacija ApoE.

Rezultati istraživanja su pokazali da su ispitanici s dijagnozom AD bili stariji i imali su manji broj godina obrazovanja u odnosu na ispitanike s amnestičkim MCI i kognitivno zdrave ispitanike. U našem istraživanju su najstariji bili ispitanici iz skupine s VAD, a broj godina obrazovanja je bio podjednako nizak i za AD i VAD skupinu. Frekvencija ApoE4 alela je bila znatno veća u AD skupini u odnosu na ostale skupine. Drugi demografski pokazatelji, poput spola, BMI i rizičnih čimbenika nisu se značajno razlikovali. Obzirom na činjenicu da smo u našem istraživanju obradili i skupinu bolesnika s dijagnozom VAD, koja je povezana s čimbenicima rizika, naša analiza podataka pokazala je značajne razlike između skupina. Koncentracija **ADPN** je bila značajno niža u populaciji bolesnika s dijagnozom MCI i AD u odnosu na kontrolnu skupinu. Blaga do umjerena korelacija koncentracije **ADPN** nađena je s brojem godina obrazovanja, BMI (negativna korelacija) i brojem bodova u MMSE testu. U

našem istraživanju nađena je negativna blaga do umjerena korelacija s koncentracijama glukoze i mokraćne kiseline i blaga pozitivna korelacija s koncentracijom HDL-kolesterola.

U slijedećoj fazi istraživanja autori su pratili 54 ispitanika s MCI i 43 kontrolna ispitanika, pri čemu su ispitanici iz MCI skupine praćeni u vremenskom rasponu koji se kretao od 11 do 64 mjeseca, a kod kontrolnih ispitanika trajanje praćenja je bilo u rasponu od 11 do 75 mjeseci. U skupini s MCI je 19 ispitanika imalo konverziju u AD, dok je u skupini kontrolnih ispitanika kod 10 postavljena dijagnoza MCI. Oni ispitanici koji su imali konverziju iz MCI u AD imali su lošije rezultate inicijalnih neuropsiholoških testova i veću frekvenciju ApoE4 genotipa. Kod kontrolnih ispitanika koji su imali konverziju u MCI nađeni su jedino lošiji rezultati neuropsiholoških testova u inicijalnom testiranju. **ADPN** se nije pokazao pouzdanim prediktorom konverzije u blagi kognitivni poremećaj, odnosno u demenciju. U ovom istraživanju autori su određivali koncentraciju ukupnog **ADPN**. Smatra se da je visokomolekularni oblik **ADPN** mnogo bolji pokazatelj, jer su dokazani njegovi anti-apoptotski učinci i zaštitno djelovanje na vaskularni endotel. U našem istraživanju smo također određivali ukupni **ADPN**. Zapreka široj upotrebi testova za visokomolekularni oblik **ADPN** leži u slaboj dostupnosti i nestandardiziranim metodama. Potencijalnu pogrešku u zaključivanju nosi i mali broj ispitanika u MCI i kontrolnoj skupini kod redovne kontrole tijekom longitudinalnog praćenja. Osim toga, autori nisu uključili u kontrolni longitudinalni pregled i bolesnike s dijagnozom AD. U istraživanju su se autori koristili matriksom seruma, koji je dostupniji od likvora. Dodatna vrijednost istraživanja bi bila u usporedbi koncentracija **ADPN** u ispitivanim skupinama u serumu i likvoru (59).

U cirkulaciji se, osim niskomolekularnog (trimera), srednjemolekularnog (heksamera) i visokomolekularnog oblika **ADPN**, može naći i globularni oblik koji nastaje djelovanjem elastaza iz neutrofilnih granulocita na monomere **ADPN**. Smatra se da takav, globularni oblik **ADPN**, koji je strukturno sličan proupalnom citokinu TNF $\alpha$ , ima svojstva koja potiču upalni odgovor, za razliku od drugih cirkulirajućih oblika koji djeluju protuupalno. Wan i suradnici ispitali su ekspresiju AdipoR1 i AdipoR2 u humanim astrocitima, učinak globularnog **ADPN** na ekspresiju i sekreciju proupalnih citokina u staničnoj liniji astrocitoma i utjecaj signalnih puteva nuklearnog čimbenika NF $\kappa$ B, MAPK, (ERK)1/2 (engl. extracellular signal-regulated kinase), JNK (engl. c-Jun N-terminal kinase) i PI3K (engl. phosphatidylinositol 3 kinase) na te procese. Dokazali su da su Adipo R1 i AdipoR2 eksprimirani u humanim astrocitima. Njihovo je istraživanje dokazalo proupalno djelovanje globularnog **ADPN** na astrocite: povećana je



sekrecija i ekspresija **IL-6** i monocitnog kemoatrakcijskog proteina (engl. monocyte chemoattractant protein, MCP), te ekspresija IL-1 $\beta$  i IL-8. Primarni receptor za globularni **ADPN** je AdipoR1. Njegovo aktiviranje povećava staničnu smrt neurona u eksperimentalnom animalnom modelu ishemijskog moždanog udara, što dodatno ukazuje na negativni utjecaj globularnog oblika **ADPN** na mozak. Korištenjem farmakoloških inhibitora proupalnog odgovora autori su dokazali uključenost signalnih puteva ERK1/2, MAPK i NF- $\kappa$ B u proupalni odgovor koji je potaknut s globularnim **ADPN** (107).

Razlike u koncentracijama biljega upale, CRP i **IL-6**, koje su nađene u našem istraživanju, u skladu su s rezultatima drugih istraživanja. Nakupljanje **A $\beta$**  i fosforiliranog **tau** proteina pokreće upalni odgovor koji za posljedicu ima otpuštanje cijelog niza upalnih citokina i kemokina u likvor i cirkulaciju.

Kada se navode podaci o incidenciji AD i VAD, nailazi se na veliku heterogenost između podataka navedenih za različita područja. Pretpostavka je da su tako različiti podaci prouzrokovani različitim ustrojem istraživanja za utvrđivanje incidencije. Velika metodološka zapreka leži i u postojanju različitih kriterija za definiranje demencije, pogotovo u slučaju VAD (108). Razlike u rezultatima intervencijskih istraživanja nastaju zbog toga što se voditelji istraživanja ne fokusiraju na mlađu populaciju kao ciljnu skupinu, upravo zbog toga što promjene vezane uz demenciju počinju mnogo godina prije pokazivanja jasnih kliničkih znakova karakterističnih za demenciju. Intervencijsko istraživanje na mlađoj populaciji povlači i neželjene financijske posljedice, jer su potrebna značajna sredstva za dugoročno praćenje takve populacije. Osim toga, kod takvih istraživanja bi se kao ishod trebao definirati MCI, tj. prodromalna faza demencije (24).

U ovom istraživanju određena je koncentracija novih potencijalnih biljega demencije i njihova povezanost sa standardnim postupcima koji se primjenjuju kod obrade bolesnika – neuropsihološkim testovima, neurosonološkim i neuroradiološkim nalazima, te rutinskim biokemijskim testovima. Ovo istraživanje nije obuhvatilo molekularnu dijagnostiku u svrhu utvrđivanja udjela ispitanika s genetskim čimbenikom rizika ApoE4 u pojedinim skupinama. Svaka skupina je sadržavala manje od 1% ispitanika koji su bili mlađi od 60 godina, ali to nije utjecalo na sveukupnu statističku obradu podataka.

Kod složenih poremećaja poput demencije zbog kompleksnosti patofiziološke podloge nije izgledno da će jedan biljeg reflektirati promjene i predvidjeti ishod bolesti. Slična iskustva su imali znanstvenici koji su primijenili određeni biljeg za praćenje efekta ispitivanog lijeka kod sindroma poput šećerne bolesti. Ispitivanje učinka lijekova za šećernu bolest ili srčano-žilna oboljenja pomoću biljega pokazali su suprotan ishod tj. ispitivani biljeg koji se smatrao relevantnim pokazateljem ishoda je snižen, ali kliničko stanje bolesnika se pogoršalo (109).

Suštinski problem zbog kojeg se ispitivani biljezi u ovom radu nisu pokazali dovoljnu diskriminatornu snagu proizlazi iz preklapanja etiopatofizioloških mehanizama AD i VAD. Etiologija AD i VAD dijele mnoge zajedničke značajke, što predstavlja veliki izazov pronalaženju idealnog diferencijalno-dijagnostičkog biljega. Istraživanja provedena na populaciji časnih sestara, tzv. Nun Study, dovela su do značajnih spoznaja povezanih s pokazivanjem kliničkih znakova demencije. Naime, nalazi obdukcije su kod nekih ispitanica pokazali jasne promjene karakteristične za postavljanje dijagnoze AD, a da kod ispitanica tijekom života nisu utvrđeni klinički znakovi demencije. Ispostavilo se da ključni čimbenik za manifestaciju jasnih kliničkih znakova demencije ne leži u uznapredovalim neurodegenerativnim promjenama u mozgu. Istovremena prisutnost vaskularnih promjena, koja dovodi do manjih ishemijskih promjena svojevrsan je „okidač“ za nastanak primjetnih znakova demencije kod pogođene osobe (110).

Otkrivanje demencije u početnoj fazi, mnogo prije nastanka jasnih kliničkih znakova, preduvjet je za efikasno liječenje. Budućnost rane dijagnostike zasnovana je na kombiniranju optimalnih biokemijskih biljega u krvi i slikovnih tehnika visoke osjetljivosti i specifičnosti.

## 6 ZAKLJUČCI

Razlika u koncentraciji **IL-6** između skupina ispitanika s AD i VAD govori o različitom intenzitetu upalnog odgovora između te dvije vrste demencije, što **IL-6** čini potencijalnim diskriminacijskim čimbenikom u diferencijalnoj dijagnostici demencija. Moguće je da su uslijed kompleksne prirode sindroma demencije i preklapajućih patofizioloških, molekularnih i biokemijskih mehanizama različitih vrsta demencija, ostali ispitivani serumski biljezi demencije bili podjednako zastupljeni u ispitivanim skupinama.

Naši rezultati ukazuju na slijedeće zaključke:

1. Koncentracije **KLK6**, **CLU** i **ADPN** ne pokazuju značajnu razliku između oboljelih od AD i VAD. Medijan koncentracije **KLK6** u skupini s AD je iznosio 2,9 ng/mL, u skupini s VAD 2,7 ng/mL, dok su u skupini s MCI i kognitivno zdravih ispitanika izmjerene koncentracije 2,6, odnosno 2,8 ng/mL. Aritmetička sredina za bolesnike s AD za **CLU** iznosila je 42,2 µg/mL, za skupinu bolesnika s VAD 37,0 µg/mL, dok je za MCI i kognitivno zdrave ispitanike iznosila 41,8, odnosno 40,5 µg/mL. Medijan koncentracije **ADPN** u skupini oboljelih od AD je bio 10,6 µg/mL, za VAD je iznosio 10,3 µg/mL, a za MCI i kognitivno zdrave 10,4 i 8,8 µg/mL.
2. Određivanje koncentracije upalnog biljega **IL-6** se pokazalo korisnim u razlikovanju AD i VAD. Populacija bolesnika s VAD je imala medijan koncentracije 4,1 pg/mL, a kod bolesnika s AD je iznosio 2,7 pg/mL ( $P=0,014$ ).
3. Upalni odgovor moždanog tkiva pogođenog cerebrovaskularnom bolešću je rezultirao s najvećom koncentracijom **IL-6** u skupini s dijagnozom vaskularne demencije (4,1 pg/mL).
4. Rezultati također ne pokazuju zadovoljavajuću mogućnost razlikovanja kognitivno zdravih ispitanika iste dobi od bolesnika s demencijom, kao što ne pokazuju diskriminacijski potencijal kada je u pitanju razlikovanje skupine iste dobi s dijagnozom MCI, od skupine s dijagnozom AD, odnosno VAD.
5. Koncentracije ispitivanih biljega ne koreliraju s rezultatima standardnih pokazatelja kognitivnog oštećenja (neuropsihološki, neuroradiološki i neurosonološki testovi).

6. Zapreka pronalasku idealnog biokemijskog biljega koji bi se koristio u diferencijalnoj dijagnostici jest sama podloga AD i VAD. Naime, radi se o procesima koji nisu jasno diferencirani i preklapaju su, što znatno otežava pronalazak jedinstvenog biljega koji će jasno razlikovati dvije najzastupljenije vrste demencije.

## 7 LITERATURA

- 1 <http://www.who.int/topics/dementia/en/>, pristupljeno 20.07.2015.
- 2 World population ageing 2013, Department of Economic and Social Affairs, Population Division , United Nations, New York, 2013.
- 3 [http://www.who.int/features/factfiles/dementia/dementia\\_facts/en/](http://www.who.int/features/factfiles/dementia/dementia_facts/en/), pristupljeno 20.07.2015.
- 4 Dementia – a public health priority. World Health Organization, 2012.
- 5 Mimica N. Demencija i palijativna skrb. Neurol Croat 2011;60:119-23.
- 6 Demarin V. Demencije. U: Neurologija za stomatologe. Demarin V, Trkanjec Z, ur. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
- 7 <http://dementia.hiim.hr/neuro.htm> Pristupljeno 21.07.2015.
- 8 Trkanjec Z. Vaskularna demencija. Medix 2014;20:197-203.
- 9 Lušić I. Dijagnostika i liječenje Alzheimerove bolesti. Medix 2014;20:188-96.
- 10 McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 2011;7:263-9.
- 11 Demarin V, Trkanjec Z. Vaskularni kognitivni poremećaji. Medix 2012;18:195-201.
- 12 Román GC, Tatemichi TK, Erkinjuntti T, Cummings JL, Masdeu JC, Garcia JH, Amaducci L, Orgogozo JM, Brun A, Hofman A, et al. Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN International Workshop. Neurology 1993;43:250-60.
- 13 Klepac N. Blagi spoznajni poremećaj. Medix 2012;18:186-9.
- 14 Menting KW, Claassen JA.  $\beta$ -secretase inhibitor; a promising novel therapeutic drug in Alzheimer's disease. Front Aging Neurosci 2014;6:165

- 
- 15 Hampel H, Blennow K. CSF tau and  $\beta$ -amyloid as biomarkers for mild cognitive impairment. *Dialogues Clin Neurosci* 2004;6:379-90.
- 16 Zhou X, Yang C, Liu Y, Li P, Yang H, Dai J, et al. Lipid rafts participate in aberrant degradative autophagic-lysosomal pathway of amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease. *Neural Regen Res* 2014;9:92-100.
- 17 Tu S, Okamoto S, Lipton SA, Xu H. Oligomeric A $\beta$ -induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 2014;9:48.
- 18 Kamboh MI, Demirci FY, Wang X, Minster RL, Carrasquillo MM, Pankratz VS, et al. Genome-wide association study of Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry* (2012) 2, e117
- 19 Guerreiro RJ, Gustafson DR, Hardy J. The genetic architecture of Alzheimer's disease: beyond APP, PSENs and APOE. *Neurobiol Aging* 2012;33:437-56.
- 20 Ong WY, Tanaka K, Dawe GS, Ittner LM, Farooqui AA. Slow excitotoxicity in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2013;35:643-68.
- 21 Rohn TT. Is apolipoprotein E4 an important risk factor for vascular dementia? *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7:3504-11.
- 22 Schnaider Beerli M, Ravona-Springer R, Silverman JM, Haroutunian V. The effects of cardiovascular risk factors on cognitive compromise. *Dialogues Clin Neurosci* 2009;11:201-12.
- 23 Lee JH, Choi Y, Jun C, Hong YS, Cho HB, Kim JE, Lyoo IK. Neurocognitive changes and their neural correlates in patients with type 2 diabetes mellitus. *Endocrinol Metab (Seoul)* 2014;29:112-21.
- 24 Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci* 2009;11:111-28.
- 25 Ngandu T, Lehtisalo J, Solomon A, Levälähti E, Ahtiluoto S, Antikainen R, et al. A 2-year multidomain intervention of diet, exercise, cognitive training, and vascular risk monitoring versus control to prevent cognitive decline in at-risk elderly people (FINGER): a randomized controlled trial. *Lancet* 2015;385:2255-63.

- 
- 26 Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. „Mini-mental-state“. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. J Psychiatr Res 1975;2:189-98.
- 27 Zavoreo I, Bašić-Kes V. Kognitivna neurorehabilitacija. Medix 2014;20:204-7.
- 28 Nasreddine ZS, Philips NA, Bedirian V, Charbonneau S, Whitehead V, Collin I, Cummings JL, Chertkow H. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: A Brief Screening Tool For Mild Cognitive Impairment. J Am Geriatr Soc 2005;53:695-99.
- 29 Medved V, Petrović R. Funkcijske metode oslikavanja mozga (*neuroimaging*) u dijagnostici demencija. Medix 2012;18:164-8.
- 30 Baber U, Mehran R, Sartori S, Schoos MM, Sillesen H, Muntendam P, Garcia MJ et al. Prevalence, impact, and predictive value of detecting subclinical coronary and carotid atherosclerosis in asymptomatic adults: the BioImage study. J Am Coll Cardiol 2015;65:1065-74.
- 31 Haratz S, Weinstein G, Molshazki N, Beeri MS, Ravona-Springer R, Marzeliak O et al. Impaired cerebral hemodynamics and cognitive performance in patients with atherothrombotic disease. J Alzheimers Dis 2015;46:137-44.
- 32 Hampel H, Broich K, Hoessler Y, Pantel J. Biological markers for early detection and pharmacological treatment of Alzheimer's disease. Dialogues Clin Neurosci 2009;11:141-57.
- 33 Babić M, Šimić G. Proteomska analiza cerebrospinalne tekućine u Alzheimerovoj bolesti. Medix 2012;18:169-73.
- 34 Han X. The pathogenic implication of abnormal interaction between Apolipoprotein E isoforms, amyloid-beta peptides, and sulfatides in Alzheimer's disease. Mol Neurobiol 2010;41:97-106.
- 35 Ravid R. Biobanks for biomarkers in neurological disorders: The Da Vinci bridge for optimal clinico-pathological connection. J Neurol Sci 2009;283:119-26.
- 36 Angelucci F, Spalletta G, di Iulio F, Ciaramella A, Salani F, Colantoni L et al. Alzheimer's disease (AD) and mild cognitive impairment (MCI) patients are characterized by increased BDNF serum levels. Curr Alzheimer Res 2010;7:15-20.

- 
- 37 O'Bryant SE, Hobson VL, Hall JR, Barber RC, Zhang S, Johnson L et al. Serum brain-derived neurotrophic factor levels are specifically associated with memory performance among Alzheimer's disease cases. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2011;31:31-6.
- 38 O'Bryant SE, Xiao G, Barber R, Reisch J, Doody R, Fairchild T et al. A serum protein-based algorithm for the detection of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2010;67:1077-81.
- 39 Buchhave P, Janciauskiene S, Zetterberg H, Blennow K, Minthon L, Hansson O. Elevated plasma levels of soluble CD40 in incipient Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2009;450:56-9.
- 40 Olson L, Humpel C. Growth factors and cytokines/chemokines as surrogate biomarkers in cerebrospinal fluid and blood for diagnosing Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Exp Gerontol* 2010;45:41-6.
- 41 Fiandaca MS, Mapstone ME, Cheema AK, Federoff HJ. The critical need for defining preclinical biomarkers in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2014;10:S196-212.
- 42 Edwards M, Hobson Balldin V, Hall J, O'Bryant S. Combining select neuropsychological assessment with blood-based biomarkers to detect mild Alzheimer's disease: a molecular neuropsychology approach. *J Alzheimers Dis* 2014;42:635-40.
- 43 Singh-Manoux A, Dugravot A, Brunner E, Kumari M, Shipley, Elbaz A, et al. Interleukin-6 and C-reactive protein as predictors of cognitive decline in late midlife. *Neurology* 2014;83:486-93.
- 44 Apostolova LG, Hwang KS, Avila D, Elashoff D, Kohannim O, Teng E et al. Brain amyloidosis ascertainment from cognitive, imaging, and peripheral blood protein measures. *Neurology* 2015;84:729-37.
- 45 Bayani J, Diamandis EP. The physiology and pathology of human kallikrein related-peptidase 6 (KLK6). *Clin Chem Lab Med* 2012;50:211-33.
- 46 Mitsui S, Okui A, Uemura H, Mizuno T, Yamada T, Yamamura Y, et al. Decreased cerebrospinal fluid levels of neurosin (KLK6), an aging-related protease, as possible new risk factor for Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2002;977:216-23.



- 
- 47 Menendez-Gonzalez M, Castro-Santos P, Calatayud MT, Perez-Pinera P, Ribacoba R, Martinez-Rivera M, et al. Plasmatic level of neurosin predicts outcome of mild cognitive impairment. *Int Arch Med* 2008;1:11.
- 48 Menendez-Gonzalez M, Castro-Santos P, Suarez A, Calatayud MT, Perez-Pinera P, Martinez M, et al. Value of measuring plasmatic levels of neurosin in the diagnosis of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2008;14:59-67.
- 49 Martinez-Morillo E, Diamandis A, Diamandis EP. Reference intervals and biological variation for kallikrein 6: influence of age and renal failure. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:931-4.
- 50 Nuutinen T, Suuronen T, Kauppinen A, Salminen A. Clusterin: A forgotten player in Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* 2009;61:89-104.
- 51 Schultz RM, Lebman MN. Proteins I: Composition and structure. U: Devlin TM, ur. *Textbook of biochemistry with clinical correlations*. New York: Wiley-Liss; 2002. str. 133-4.
- 52 Charnay Y, Imhof A, Vallet PG, Kovari E, Bouras C, Giannakopoulos P. Clusterin in neurological disorders: Molecular perspectives and clinical relevance. *Brain Res Bull* 2012;88:434-43.
- 53 Trougakos IP. The molecular chaperone apolipoprotein J/Clusterin as a sensor of oxidative stress: implications in therapeutic approaches – a mini-review. *Gerontology* 2013;59:514-23.
- 54 Desikan RS, Thompson WK, Holland D, Hess CP, Brewer JB, Zetterberg H, et al. The role of clusterin in amyloid- $\beta$  associated neurodegeneration. *JAMA Neurol* 2014;71:180-7.
- 55 Li X, Ma Y, Wei X, Li Y, Wu H, Zhuang J, et al. Clusterin in Alzheimer's disease: a player in the biological behavior of amyloid-beta. *Neurosci Bull* 2014;30:162-8.
- 56 Mukaetova-Ladinska EB, Abdel-All Z, Andrade J, Alves da Silva J, O'Brien JT, Kalaria RN. Plasma and platelet clusterin ratio is altered in Alzheimer's disease patients with distinct neuropsychiatric symptoms: findings from a pilot study. *Int J Geriatr Psychiatry* 2015;30:368-75.
- 57 Song J, Lee JE. Adiponectin as a new paradigm for approaching Alzheimer's disease. *Anat Cell Biol* 2013;46:229-34.

---

58 Song J, Lee WT, Park KA, Lee JE. Association between risk factors for vascular dementia and adiponectin. *Biomed Res Int* 2014;2014:261672.

59 Teixeira AL, Diniz BS, Campos AC, Miranda AS, Rocha NP, Talib LL et al. Decreased levels of circulating adiponectin in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuromol Med* 2013;15:115-21.

60 Wu YY, Hsu JL, Wang HC, Wu SJ, Hong CJ, Cheng IH. Alterations of the neuroinflammatory markers **IL-6** and TRAIL in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra* 2015;5:424-34.

61 Delaby C, Gabelle A, Blum D, Schraen-Maschke S, Moulinier A, Boulanghien J et al. Central nervous system and peripheral inflammatory processes in Alzheimer's disease: biomarker profiling approach. *Front Neurol* 2015;6:181.

62 Fraga VG, Guimaraes HC, Teixeira AL, Barbosa MT, Mateo ECC, Carvalho MG et al. Genetic predisposition to higher production of interleukin-6 through -174 G>C polymorphism predicts global cognitive decline in oldest-old with cognitive impairment no dementia. *Arg Neuropsychiatr* 2015;73:899-902.

63 Brosseron F, Krauthausen M, Kummer M, Heneka MT. Body fluid cytokine levels in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a comparative overview. *Mol Neurobiol* 2014;50:534-44.

64 Petersen RC, Roberts RO, Knopman DS, Boeve BF, Geda YE, Ivnik RJ, et al. Mild cognitive impairment. Ten years later. *Arch Neurol* 2009;66:1447-55.

65 Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr et al. Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 2003;42:1206-52.

66 Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997;20:1183-97.

- 
- 67 Ginat DT, Bhatt S, Sidhu R, Dogra V. Carotid and vertebral artery Doppler ultrasound waveforms: a pictorial review. *Ultrasound Q*. 2011;27:81-5.
- 68 Rundek T, Demarin V. Carotid intima-media thickness (IMT): a surrogate marker of atherosclerosis. *Acta Clin Croat* 2006;45:45-51.
- 69 Jurašić MJ, Josef-Golubić S, Šarac R, Lovrenčić-Huzjan A, Demarin V. Beta-stiffness - setting age standard. *Acta Clin Croat* 2009;48:253-8.
- 70 Silvestrini M, Pasqualetti P, Baruffaldi R, Bartolini M, Handouk Y, Matteis M et al. Cerebrovascular reactivity and cognitive decline in patients with Alzheimer disease. *Stroke* 2006;37:1010-5.
- 71 Martinic Popovic I, Seric V, Demarin V. Mild cognitive impairment in symptomatic and asymptomatic cerebrovascular disease. *J Neurol Sci* 2007;257:185-93.
- 72 Upute iz pakiranja, **IL-6** (Interleukin-6), cobas Ref. 05109442190, Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim, 2014-02, V 6.0 English
- 73 Upute iz pakiranja, Adiponectin (**ADPN**), Randox Laboratories Limited, 55 Diamond Road, Crumlin, County Antrim, United Kingdom, 08 Aug 13 bm
- 74 Upute iz pakiranja, Human Clusterin ELISA, BioVendor-Laboratorni medicina a.s., Karasek 1767/1, Brno, Czech Republic, ENG.002.A
- 75 Silobrić Radić M, Hrabak-Žerjavić V, Tomić B. Mentalne bolesti i poremećaji u Republici Hrvatskoj. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, 2004.
- 76 Poljičanin T, Benjak T ur. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2014. godinu. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, 2015.
- 77 Gandy S, Ikonomic MD, Mitsis E, Elder G, Ahlers ST, Barth J, Stone JR, DeKosky ST. Chronic traumatic encephalopathy: clinical biomarker correlations and current concepts in pathogenesis. *Mol Neurodegener* 2014; 9:37.
- 78 DeKosky ST, Blennow K, Ikonomic MD, Gandy S. Acute and chronic traumatic encephalopathies: pathogenesis and biomarkers. *Nat Rev Neurol* 2013; 9: 192–200.

---

79 McKee AC, Stein TD, Kieman PT, Alvarez VE. The neuropathology of chronic traumatic encephalopathy. *Brain Pathol* 2015; 25:350-64.

80 Mitsis EM, Riggio S, Kostakoglu L, Dickstein DL, Machac J, Delman B et al. Tauopathy PET and amyloid PET in the diagnosis of chronic traumatic encephalopathies: studies of a retired NFL player and of a man with FTD and a severe head injury. *Transl Psychiatry* 2014;4:e411.

81 Deutsch MB, Mendez MF. Neurocognitive features distinguishing primary central nervous system lymphoma from other possible causes of rapidly progressive dementia. *Cogn Behav Neurol* 2015;28:1-10.

82 Ray A, Anjila S, Hdeib AM, Radhakrishnan A, Nock CJ, Cohen ML et al. Extracranial metastasis of glioblastoma: Three illustrative cases and current review of the molecular pathology and management strategies. *Mol Clin Oncol* 2015; 3: 479-86.

83 Gavranić A, Šimić H, Vukas D, Stanković B, Bajek G, Kolić Z. Neurokirurški postupci liječenja hidrocefalusa. *Medicina fiumensis* 2011;47:180-4.

84 Krmpotić D, Čikeš N, Krmpotić P. Paraneoplastički sindrom povezan s antifosfolipidnim protutijelima. *Liječ Vjesn* 2004;126:155-60.

85 Jung NY, Kim E. Cerebral phaeohyphomycosis: a rare cause of brain abscess. *J Korean Neurosurg Soc* 2014;56:444-7.

86 Motoyama Y, Hashimoto H, Ishida Y, Iida J. Spontaneous rupture of a presumed colloid cyst of the third ventricle-case report. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2002;42:228-31.

87 Alhurani RE, Vassilaki M, Aakre JA, Mielke MM, Kremers WK, Machulda MM et al. Decline in weight and incident mild cognitive impairment: Mayo clinic study of aging. *JAMA Neurol* 2016;73:439-46.

88 Mirza SS, Portegies ML, Wolters FJ, Hofman A, Koudstaal PJ, Tiemeier H et al. Higher education is associated with a lower risk of dementia after a stroke or TIA. *Neuroepidemiology* 2016;46:120-7.

89 Rouch L, Cestac P, Hanon O, Cool C, Helmer C, Bouhanick B et al. CO-13: Temporal evolution of cognitive changes in hypertension and potential effect modification by

---

antihypertensive treatment status. VISAT cohort study. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* 2015;64:S8.

90 Xu W, Tan L, Wang HF, Jiang T, Tan MS, Tan L et al. Meta-analysis of modifiable risk factors for Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2015;86:1299-306.

91 Walters K, Hardoon S, Petersen I, Iliffe S, Omar RZ, Nazareth I et al. Predicting dementia risk in primary care: development and validation of the Dementia Risk Score using routinely collected data *BMC Med* 2016;14:6.

92 Lafortune L, Martin S, Kelly S, Kuhn I, Remes O, Cowan A et al. Behavioural Risk Factors in Mid-Life Associated with Successful Ageing, Disability, Dementia and Frailty in Later Life: A Rapid Systematic Review. *PLoS One*. 2016;11:e0144405.

93 Ogawa K, Yamada T, Tsujioka Y, Taguchi J, Takahashi M, Tsuboi Y et al. Localization of a novel type trypsin-like serine protease, neurosin, in brain tissues of Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Psychiatry Clin Neurosci* 2000;54:419-26.

94 Diamandis EP, Yousef GM, Luo LY, Magklara A, Obiezu CV. The new human kallikrein gene family: implications in carcinogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11:54-60.

95 Diamandis EP, Yousef GM, Soosaipillai AR, Bunting P. Human kallikrein 6 (Zyme/Protease M/Neurosin): A new serum biomarker of ovarian carcinoma. *Clin Biochem* 2000;33:579-83.

96 Darling MR, Jackson-Boeters L, Daley TD, Diamandis EP. Human kallikrein 6 expression in salivary gland tumors. *J Histochem Cytochem* 2006;54:337-42.

97 Yousef GM, Kishi T, Diamandis EP. Role of kallikrein enzymes in the central nervous system. *Clin Chim Acta* 2003;329:1-8.

98 Wang Y, Luo W, Reiser G. Trypsin and trypsin-like proteases in the brain: Proteolysis and cellular functions. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:237-52.

99 Tatebe H, Watanabe Y, Kasai T, Mizuno T, Nagakawa M, Tanaka M et al. Extracellular neurosin degrades  $\alpha$  sinuklein in cultured cells. *Neurosci Res* 2010;67:341-6.

100 Scarisbrick IA, Epstein B, Cloud BA, Yoon H, Wu J, Renner DN et al. Functional role of kallikrein 6 in regulating immune cell survival. *PloS One* 2011;6:e18376.

- 
- 101 Park S, Mathis KW, Lee IK. The physiological roles of apolipoprotein J/clusterin in metabolic and cardiovascular diseases. *Rev Endocr Metab Disord* 2014;15:45-53.
- 102 Thambisetty M, Simmons A, Velayudhan L, Hye A, Campbell J, Kinsey A, et al. Association of plasma clusterin concentration with severity, pathology, and progression in Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* 2010;67:739-48.
- 103 Thambisetty M, An Y, Kinsey A, Koka D, Saleem M, Güntert A et al. Plasma clusterin concentration is associated with longitudinal brain atrophy in mild cognitive impairment. *Neuroimage* 2012;59:212-7.
- 104 Thambisetty M. Do extracellular chaperone proteins in plasma have potential as Alzheimer's disease biomarkers? *Biomarkers Med* 2010;4:831-4.
- 105 Thambisetty M, Beason-Held LL, An Y, Kraut M, Nalls M, Hernandez DG et al. Alzheimer risk variant CLU and brain function during aging. *Biol Psychiatry* 2013;73:399-405.
- 106 Warren MW, Hyman LS, Weiner MF, Texas Alzheimer's Research and Care Consortium. Lipids and adipokines as risk factors for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2012;29:151-7.
- 107 Wan Z, Mah D, Simtchouk S, Klegeris A, Little JP. Globular adiponectin induces a pro-inflammatory response in human astrocytic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;446:37-42.
- 108 Chui HC, Mack W, Jackson EJ, Mungas D, Reed BR, Tinklenberg J, et al. Clinical criteria for the diagnosis of vascular dementia. *Arch Neurol* 2000;57:191-6.
- 109 Shineman DW, Fillit HM. Novel strategies for the prevention of dementia from Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci* 2009;11:129-34.
- 110 Korczyn AD. Is dementia preventable? *Dialogues Clin Neurosci* 2009;11:213-6.

## 8. POPIS KRATICA

A $\beta$  amiloid- $\beta$  protein

AD Alzheimerova bolest (engl. Alzheimer's disease)

ADPN adiponektin

AI engl. augmentation index

APP amilodni prekursorski protein

BACE 1 engl.  $\beta$ -site APP-cleaving enzyme

BDNF neurotrofni moždani čimbenik (engl. brain-derived neurotrophic factor)

BHI engl. breath holding index

BMI indeks tjelesne mase (engl. body mass index)

BSI  $\beta$  indeks krutosti (engl.  $\beta$  stiffness index)

CDc engl. carotid diameter change

CLU klasterin (engl. clusterin)

CRP C-reaktivni protein

CV koeficijent varijacije (engl. coefficient of variation)

IL-6 interleukin-6

IMT zadebljanje intime i medije (engl. intima-media thickness)

KLK6 humani kalikrein 6, neurozin

KZI kognitivno zdravi ispitanici

MCI blagi kognitivni poremećaj (engl. mild cognitive impairment)

MMSE engl. Mini-Mental State Examination

MoCA engl. Montreal Cognitive Assessment

NINCDS-ADRDA engl. National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association

VAD vaskularna demencija



## 9. ŽIVOTOPIS

Lora Dukić rođena je 4. lipnja 1970. u Šibeniku. Nakon završetka srednjoškolskog obrazovanja u Šibeniku, 1988. godine upisuje se na studij Medicinske biokemije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je 1993. godine. Stručni ispit položila je 1995. godine, nakon pripravničkog staža u Kliničkom zavodu za kemiju KB „Sestre milosrdnice“. U razdoblju od 1995. do 1998. godine radila je u tvrtkama koje zastupaju proizvođače laboratorijske opreme. Od 1998. do 2010. godine radila je kao voditeljica Medicinsko-biokemijskog laboratorija u Splitu i tijekom tog razdoblja pohađala je poslijediplomski doktorski studij iz Medicinske biokemije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2010. godine zaposlena je u Kliničkom zavodu za kemiju KBC „Sestre milosrdnice“, gdje pohađa specijalističko usavršavanje magistara medicinske biokemije, specijalizaciju iz Medicinske biokemije i laboratorijske medicine. U okviru programa specijalističkog usavršavanja upisala je poslijediplomski specijalistički studij iz Medicinske biokemije i laboratorijske medicine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i u studenom 2016. položila je specijalistički ispit.

Sudjelovala je kao pozvani predavač na tečajevima trajne edukacije u organizaciji Hrvatske komore medicinskih biokemičara. Aktivno je sudjelovala na nacionalnim i internacionalnim skupovima.

Popis objavljenih radova:

1. Kackov S, Simundic AM, Nikolac N, Celap I, Dukic L, Ruzic D, Bilusic M. The effect of high-calorie meal consumption on oxidative stress and endothelial dysfunction in healthy male adults. *Physiol Res* 2013;62:643-52.
2. Saracevic A, Simundic AM, Dukic L. The stability of ethanol in unstoppered tubes. *Clin Biochem* 2014;47:92-5.
3. Dukić L, Šimundić AM, Malogorski D. Comparison of digoxin concentration in plastic serum tubes with clot activator and heparinized plasma tubes. *Biochem Med* 2014;24:146-50.
4. Dukić L, Šimundić AM. Institutional practices and policies in acid-base testing: a self-reported survey study on behalf of the Croatian society of medical biochemistry and laboratory medicine Working group for acid-base balance. *Biochem Med* 2014;24:281-92.
5. Martinic-Popovic I, Simundic AM, Dukic L, Lovrencic-Huzjan A, Popovic A, Seric V, Basic-Kes V, Demarin V. The association of inflammatory markers with cerebral

vasoreactivity and carotid atherosclerosis in transient ischemic attack. Clin Biochem 2014;47:182-6.

6. Dukic L, Simundic AM. Short-term and long-term storage stability of heparin plasma ammonia. J Clin Pathol 2015;68:288-91.
7. Pozaic P, Dukic L, Simundic AM. The effect of hemolysis, icterus and lipemia on Randox immunoturbidimetric adiponectin assay. Clin Chim Acta 2015;450:64-6.
8. Dukic L, Simundic AM, Martinic-Popovic I, Kackov S, Diamandis A, Begcevic I, Diamandis E P. The role of human kallikrein 6, clusterin and adiponectin as potential blood biomarkers of dementia. Clin Biochem 2016;49:213-8.
9. Dukic L, Jokic A, Kules J, Pasalic D. The knowledge and understanding of preanalytical phase among biomedicine students at the University of Zagreb. Biochem Med (Zagreb) 2016;26:90-7.
10. Margetić S, Čelap I, Dukić L, Vukasović I, Virović-Jukić L. Interference of M-protein on prothrombin time test – case report. Biochem Med (Zagreb) 2016;26:248-54.
11. Dukić L, Milevoj Kopčinović L, Dorotić A, Baršić I. Blood gas testing and related measurements: National recommendations on behalf of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. Biochem Med (Zagreb) 2016;26:318-36.

Popis poglavlja u priručnicima:

1. Dukić L. Osobitosti uzorka za određivanje acidobazične ravnoteže i ioniziranog kalcija u: Šimundić AM, ur. Predanalitička faza laboratorijskog rada. Medicinska naklada, Zagreb, 2012. str. 51-62.
2. Dukić L. Intrapartalna pH-metrija u Nikolac N, ur. Uloga laboratorija u pre-, peri- i neonatalnoj skrbi. Medicinska naklada, Zagreb, 2012. str. 21-6.
3. Dukić L. Biološka varijabilnost u: Šimundić AM, ur. Upravljanje kvalitetom laboratorijskog rada. Medicinska naklada, Zagreb, 2013. str. 41-9.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

## ZNAČAJNOST KONCENTRACIJE NEUROZINA I KLASTERINA U DIFERENCIJALNOJ DIJAGNOSTICI DEMENCIJA

Lora Dukić

### SAŽETAK

Alzheimerova bolest (engl. Alzheimer's disease, AD) je najčešća demencija karakterizirana stvaranjem plakova i neurofibrilarnih spletova. Vaskularna demencija (VAD) je druga najučestalija vrsta demencije i nastaje uslijed ishemijskih, hipoperfuzijskih ili hemoragičnih moždanih lezija. Ciljevi ovog rada su: ispitati diferencijalno dijagnostičko značenje određivanja serumske koncentracije neurozina (humanog kalikreina 6, KLK6), klasterina (CLU) i adiponektina (ADPN), te upalnog biljega interleukina-6 (IL-6) u razlikovanju AD i VAD; procijeniti značenje ispitivanih biljega u razlikovanju kognitivno zdravih ispitanika iste dobi od oboljelih od demencije i onih ispitanika iste dobi koji imaju blagi kognitivni poremećaj u odnosu na one s dijagnozom AD i VAD; procijeniti korelaciju ispitivanih biljega sa standardnim pokazateljima kognitivnog deficita.

Ispitivanjem je obuhvaćeno 70 bolesnika s AD i 67 bolesnika s VAD koji su u neprekidnom slijedu pristizali na redovnu neurološku obradu u Kliniku za neurologiju KBC-a Sestre milosrdnice u Zagrebu. Skupina kontrolnih ispitanika iste dobi podijeljena je na kognitivno zdrave ( $N = 50$ ) i one s blagim kognitivnim poremećajem ( $N = 48$ ). U okviru rutinske neurološke obrade provedeni su neuropsihološki testovi Mini Mental State Examination (MMSE) i Montreal Cognitive Assessment (MoCA). Korištene su slikovne tehnike: kompjuterizirana tomografija mozga (MSCT), Colour Doppler Flow Imaging (CDFI) i transkranijaska Doppler sonografija. Rutinski biokemijski testovi izrađeni su na automatskom biokemijskom analizatoru. Koncentracije biljega KLK6 i CLU su određene ELISA metodom, a koncentracija ADPN je određena imunoturbidimetrijom na automatskom biokemijskom analizatoru. Koncentracija IL-6 je određena na imunokemijskom analizatoru. Ovisno o vrsti razdiobe dobivenih rezultata, za testiranje razlika korišteni su statistički testovi Kruskal Wallis i ANOVA. Za analizu korelacije koristio se Spearmanov, odnosno Pearsonov test. Statistička analiza provedena je pomoću programa MedCalc.

Kod ispitivanih skupina je nađena razlika za one testove koji se rutinski koriste u neurološkoj obradi dementnih bolesnika. Koncentracije ispitivanih biljega KLK6, CLU i ADPN u serumu nisu se razlikovale između skupina ( $P = 0,137$ ,  $P = 0,178$  i  $P = 0,268$ ). Koncentracije upalnog biljega IL-6 značajno su se razlikovale između ispitivanih skupina ( $P = 0,014$ ), s najvećim medijanom koncentracije u skupini bolesnika s VAD (4,1 pg/mL) i najmanjim medijanom koncentracije u skupini s MCI (2,3 pg/mL).

Koncentracije ispitivanih biljega KLK6, CLU i ADPN nisu se značajno razlikovale između oboljelih od AD i VAD. Također, ispitivani biljezi ne pokazuju zadovoljavajuću mogućnost razlikovanja kognitivno zdravih ispitanika iste dobi od bolesnika s demencijom, kao što ne pokazuju diskriminacijski potencijal kada je u pitanju razlikovanje skupine iste dobi s dijagnozom blagog kognitivnog poremećaja od skupine s dijagnozom AD, odnosno VAD. Određivanje koncentracije upalnog biljega IL-6 se pokazalo korisnim u razlikovanju ispitivanih skupina. Koncentracije ispitivanih biljega nisu korelirale sa rezultatima standardnih pokazatelja kognitivnog oštećenja.

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 88 stranica, 11 slika, 13 tablica i 110 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: neurozin/humani kalikrein 6/klasterin/adiponektin/interleukin-6/demencija

Mentor: dr. sc. Ana-Maria Šimundić, izv. prof.

Ocjenjivači: dr. sc. Tihana Žanić-Grubišić, red. prof.

Akademkinja Vida Demarin

dr. sc. Ivana Čepelak, Professor Emeritus

Rad prihvaćen: 23. studenog 2016.



## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Doctoral thesis

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

### SIGNIFICANCE OF NEUROSIN AND CLUSTERIN CONCENTRATION IN DIFFERENTIAL DIAGNOSTICS OF DEMENTIA

Lora Dukić

#### SUMMARY

Alzheimer's disease (AD) is the most frequent dementia characterized by formation of plaques and neurofibrillary tangles. Vascular dementia (VAD) is the second most frequent type of dementia, which is caused by ischemic, hypoperfusive or hemorrhagic brain lesions. The aims of this study are: assessment of potential serum biomarkers neurosin (human kallikrein 6, KLK6), clusterin (CLU), adiponectin (ADPN) and inflammatory marker interleukin – 6 (IL-6) in differential diagnostics of AD and VAD; assessment of potential of KLK6, CLU, ADPN and IL-6 to separate age-matched cognitively healthy individuals from those who are demented and to separate those individuals with symptoms of mild cognitive impairment (MCI) from those with overt AD or VAD; assessment of correlation of KLK6, CLU, ADPN and IL-6 with results of parameters regularly used for determination of cognitive deficit.

70 patients with diagnosis of AD and 67 patients with VAD were included in study in consecutive order during their routine neurological follow-up in University Department of Neurology in Medical School University Hospital Sestre milosrdnice, Zagreb. Control group of age-matched individuals consisted of cognitively healthy individuals (N = 50) and those with mild cognitive impairment (MCI) (N = 48). Neuropsychological tests Mini Mental State Examination (MMSE) and Montreal Cognitive Assessment (MoCA) were done as part of routine neurological examination. Neuroimaging techniques multi slice computed tomography (MSCT), Colour Doppler Flow Imaging (CDFI) and transcranial Doppler sonography were used. Routine biochemistry tests were determined on automated biochemistry analyzer. Concentrations of potential biomarkers were measured using ELISA method for KLK6 and CLU, and concentration of ADPN was measured using immunoturbidimetry on automated biochemistry analyzer. Concentration of IL-6 was determined using immunochemistry analyzer. Depending on data distribution, statistic tests Kruskal Wallis and ANOVA were used for difference testing. For correlation analysis Spearman and Pearson tests were performed. Statistical analysis was done with MedCalc program.

Difference between tested groups was found for those tests which are routinely used for neurological follow-up of demented patients. Concentrations of potential biomarkers KLK6, CLU and ADPN did not differ between tested participant groups ( $P = 0,137$ ,  $P = 0,178$  and  $P = 0,268$ ). Concentrations of IL-6 were significantly different for tested groups ( $P = 0,014$ ), with highest median of concentration in VAD group (4,1 pg/mL) and lowest median of concentration in MCI group (2,3 pg/mL).

Concentrations of investigated biomarkers KLK6, CLU and ADPN did not differ significantly between AD and VAD patient group. Also, capability of tested biomarkers to differentiate age-matched cognitively healthy participants from patients with diagnosis of dementia was not sufficient, as well as their discriminating potential for age-matched participants with MCI compared to AD and VAD patient groups. Measurement of concentration of inflammatory marker IL-6 proved to be useful in discriminating between tested groups. Concentrations of potential biomarkers did not correlate with results of standard indicators of cognitive deficiency.

The thesis is deposited in the Central Library of Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 88 pages, 11 figures, 13 tables and 110 references. Original is in Croatian language.

Keywords: neurosin/human kallikrein 6/clusterin/adiponectin/interleukin-6/dementia

Menthor: Ana-Maria Šimundić, Ph. D., Associate Professor

Reviewers: Tihana Žanić-Grubišić, Ph. D., Full Professor

Vida Demarin, Fellow of the Croatian Academy of Sciences and Arts

Ivana Čepelak, Ph. D., Professor Emeritus

The thesis accepted: 23rd November 2016